



UNIVERSITÉ DU QUÉBEC

MÉMOIRE

PRÉSENTÉ À

L'UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À CHICOUTMI

COMME EXIGENCE PARTIELLE

DE LA MAÎTRISE EN RESSOURCES RENOUVELABLES

PAR

MARIE-ANNE BOUCHER

B. Sc. (CHIMIE)

CARACTÉRISATION CHIMIQUE ET ÉVALUATION DU POTENTIEL  
ANTIBACTÉRIEN DES HUILES ESSENTIELLES DE *TUSSILAGO FARFARA* (L.)  
ET DE *TANACETUM VULGARE* (L.)

DÉCEMBRE 2015

## RÉSUMÉ

Les résistances bactériennes aux antibiotiques sont de plus en plus nombreuses et ce phénomène s'avère une préoccupation très importante de la communauté médicale. L'utilisation des antibiotiques commerciaux comme promoteurs de croissance animale est l'une des causes probables. La substitution de ceux-ci par des produits naturels antibactériens, tels que les huiles essentielles, est une alternative intéressante. En effet, les huiles essentielles sont largement connues pour leurs propriétés antimicrobiennes. Par contre, celles provenant de la forêt boréale ont rarement constitué un sujet d'étude. Les plantes qui la composent forment donc une banque potentielle de nouveaux promoteurs de croissance. C'est dans ce but que le Laboratoire d'Analyse et de Séparation des Essences Végétales (LASEVE) de l'Université du Québec à Chicoutimi a mis en place ce projet de recherche. Un criblage chimique et biologique a été effectué sur 17 plantes de la forêt boréale. Lors de ces travaux, ce sont *Tussilago farfara* (L.) et *Tanacetum vulgare* (L.) qui se sont démarqués pour leurs compositions chimiques particulières et leurs activités biologiques. Ces deux huiles sont actives contre *E. coli* (*T. farfara* : MIC<sub>90</sub> = 1511 ± 85 µg; *T. vulgare* : MIC<sub>90</sub> = 331 ± 7 µg) et *S. aureus* (*T. farfara* : MIC<sub>90</sub> = 170 ± 11 µg; *T. vulgare* : MIC<sub>90</sub> = 228 ± 22 µg). Afin d'identifier les molécules principalement responsables de ces activités antibactériennes, les compositions chimiques ont été analysées par chromatographie gazeuse. L'huile essentielle de *T. farfara* est composée de molécules aliphatiques (42%), de monoterpènes (32%), de sesquiterpènes (10 %) et d'acides gras (5 %). Les composés majoritaires sont le 1-nonène (40 %), l'α-phellandrène (26 %), le p-cymène (7 %), le 1,10-undecadiène (4 %), l'acide dodécanoïque (2 %) ainsi que le 1-decène (1 %). L'activité antibactérienne contre *E. coli* de cette huile essentielle est expliquée par l'acide dodécanoïque (6,6 ± 0,4 µg), le 1-decène (11 ± 1 µg), l'α-phellandrène (12 ± 1 µg), le β-caryophyllène (24 ± 1 µg), le (E)-cyclodécène (25,8 ± 0,9 µg), le p-cymène (26,3 ± 3,1 µg), le tricosane (31 ± 2 µg) et le tétracosane (35 ± 4 µg). Contre *S. aureus* se sont le p-cymène et l'acide dodécanoïque, respectivement avec une MIC<sub>90</sub> de 5,6 ± 0,2 µg et 6,0 ± 0,2 µg, qui sont, en partie, à l'origine de l'activité. Pour ce qui est de *T. vulgare*, l'huile est plutôt composée de monoterpènes (89 %) et de sesquiterpènes (6 %). La majeure partie étant constituée de camphre (30 %), de bornéol (10 %), de 1,8-cinéole (10 %), de camphène (7 %) et de l'acétate de bornyle (5 %). Ce sont l'α-phellandrène (10 ± 1 µg), le β-caryophyllène (16 ± 1 µg), l'acétate de bornyle (21 ± 1 µg), l'oxide de caryophyllène (21 ± 1 µg), le camphre (22 ± 1 µg) ainsi que le p-cymène (26 ± 3 µg) qui expliquent l'activité de cette huile contre *E. coli*. L'activité contre *S. aureus* est, quant à elle, expliquée par le p-cymène (5,6 ± 0,2 µg) et le camphre (26,3 ± 3,1 µg). En conclusion, nos résultats montrent que la forêt boréale est une source d'huiles essentielles qui ont de propriétés antibactériennes. Elles pourraient être envisagées comme remplacement aux antibiotiques commerciaux actuellement utilisés comme facteur de croissance.

## REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier mon directeur de recherche qui a cru en moi tout au long de mes études que ce soit au baccalauréat comme à la maîtrise. Il a su me donner des conseils judicieux lorsque j'en avais besoin. De plus, merci à mon codirecteur qui m'a accueillie dans son laboratoire au cours de ma maîtrise et qui a su m'éclairer dans mes moments de doutes.

Je tiens à remercier Héroïse Côté, étudiante de doctorat. En travaillant de pair avec elle, j'ai appris à connaître une jeune femme formidable. Un gros merci à mon ami Hubert Marceau qui grâce à un talent inestimable m'a fourni des articles scientifiques à la demande.

Des remerciements très importants vont à tous mes collègues du LASEVE qui ont patiemment répondu à mes questions. Je pense à Karl Girard-Lalancette, Catherine Dussault, Alexis St-Gelais, François Simard, Serge Lavoie, Balla Sylla, Benoit Roger, Carole Grenon et Hélène Gagnon.

Enfin, je veux remercier tous ceux qui, de près ou de loin, m'ont supporté durant ma maîtrise. Un gros merci à mes amis et à mes très chers parents qui ont toujours été derrière moi quand j'en avais besoin.

Finalement, je remercie le Fonds de recherche québécois sur la nature et les technologies (FQRNT) d'avoir supporté financièrement ce projet de recherche et ainsi permis l'octroi de ma bourse d'études.

## TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS.....	III
TABLE DES MATIÈRES.....	IV
LISTE DES FIGURES.....	VII
LISTE DES TABLEAUX.....	VIII
CHAPITRE 1.....	1
PROBLÉMATIQUE ET OBJECTIFS.....	1
<u>1.1 Problématique</u> .....	2
<u>1.2 Objectifs</u> .....	5
1.2.1 Objectif principal.....	5
1.2.2 Sous-objectifs.....	6
CHAPITRE 2.....	7
ÉTAT DES CONNAISSANCES.....	7
<u>2.1 Les Résistances bactériennes</u> .....	8
<u>2.3 Les huiles essentielles</u> .....	10
2.3.1 Les procédés d'extraction.....	10
2.3.2 La composition chimique des huiles essentielles.....	13
2.3.3 Toxicité des huiles essentielles.....	16
2.3.4 Variation dans la composition des huiles essentielles : chemotypes.....	16
2.3.5 Activités biologiques des huiles essentielles.....	17
2.3.5.1 Activité antibactérienne des huiles essentielles.....	18
<u>2.4 Les plantes étudiées</u> .....	19
2.4.1 Tussilage ( <i>Tussilago farfara</i> L.).....	21
2.4.1.1 Description physique.....	21
2.4.1.2 Distribution géographique.....	22
2.4.1.2 Activités biologiques.....	22
2.4.1.2.1 Activité antitussive.....	23
2.4.1.2.2 Potentiel antidiabétique.....	23

2.4.1.2.3 Activité anti-inflammatoire .....	24
2.4.1.2.4 Neuroprotecteur .....	25
2.4.1.2.5 Activité antioxydante .....	26
2.4.1.2.6 Stimulant cardiovasculaire .....	26
2.4.1.2.7 Toxicité .....	26
2.4.1.2.8 Activité antibactérienne .....	27
2.4.1.3 Composition chimique .....	27
2.4.1.3.1 Composition chimique de l'huile essentielle de <i>T. farfara</i> .....	29
2.4.2 Tanaisie vulgaire ( <i>Tanacetum vulgare</i> ).....	31
2.4.2.1 Description physique .....	31
2.4.2.2 Distribution géographique.....	32
2.4.2.3 Activités biologiques .....	32
2.4.2.3.1 Utilisation ancestrale de la plante.....	32
2.4.2.3.2 Activité anti-inflammatoire .....	33
2.4.2.3.3 Activité antioxydante et antiradicalaire .....	33
2.4.2.3.4 Potentiel antibactérien et antifongique .....	34
2.4.2.3.5 Toxicité.....	35
2.4.2.3.6 Vasodilatateur .....	35
2.4.2.3.7 Diurétique.....	35
2.4.2.3.8 Insecticide et insectifuge .....	35
2.4.2.3.8 Effet attracteur de la plante envers les insectes.....	36
2.4.2.3.9 Stimulation de la croissance.....	36
2.4.2.4 Composition chimique .....	38
2.4.2.5.1 Composition de l'huile essentielle .....	40
CHAPITRE 3 .....	43
ARTICLE SCIENTIFIQUE 1 .....	43
CARACTÉRISATION CHIMIQUE ET ÉVALUATION DE L'ACTIVITÉ ANTIBACTÉRIENNE DE L'HUILE ESSENTIELLE DE <i>TUSSILAGO FARFARA</i> L. .....	43

CHAPITRE 4 .....	60
ARTICLE SCIENTIFIQUE 2 .....	60
POTENTIEL ANTIBACTÉRIEN, ANTIOXYDANT, CYTOTOXIQUE ET ANTI- INFLAMMATOIRE DE DEUX CHEMOTYPES DE L'HUILE ESSENTIELLE DE <i>TANACETUM VULGARE L.</i> .....	60
CHAPITRE 5 .....	85
SOMMAIRE DES TRAVAUX NON PUBLIÉS .....	85
<u>5.1 Méthodologie</u> .....	86
5.1.1 Récolte du matériel végétal .....	86
5.1.2 Extraction des huiles essentielles .....	88
5.1.3 Caractérisation chimique des huiles essentielles .....	88
5.1.4 Identification des composés .....	89
5.1.5 Évaluation de l'activité antibactérienne des huiles essentielles .....	89
<u>5.2 Résultats</u> .....	90
5.2.1 Rendement d'extraction des huiles essentielles .....	90
5.2.2 Activités antibactériennes des huiles essentielles .....	92
5.2.3 Caractérisation chimique des huiles essentielles .....	93
CHAPITRE 6 .....	106
CONCLUSION ET PERSPECTIVES FUTURES .....	106
CHAPITRE 7 .....	109
BIBLIOGRAPHIE .....	109

## LISTE DES FIGURES

Figure 1. Structure chimique de deux composés antibactériens retrouvés dans certaines huiles essentielles dont <i>Thymus vulgaris</i> .....	4
Figure 2. Exemples de composés retrouvés dans les huiles essentielles .....	15
Figure 3. Fleurs (a) et feuilles (b) de <i>Tussilago farfara</i> .....	21
Figure 4. Principaux composés actifs isolés de <i>T. farfara</i> .....	25
Figure 5. <i>Tanacetum vulgare</i> .....	31
Figure 6. Système d'extraction des huiles essentielles .....	88



## LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Exemple de composés identifiés dans différents extraits de <i>T. farfara</i>	27
Tableau 2. Composition chimique d'huiles essentielles de <i>T. farfara</i> issues de populations européennes .....	30
Tableau 3. Exemple de composés isolés de <i>T. vulgare</i> présentant des activités biologiques .....	37
Tableau 4. Exemple de composés présents dans différents extraits de <i>T. vulgare</i>	38
Tableau 5. Les divers chémotypes de <i>Tanacetum vulgare</i> identifiés dans la littérature scientifique .....	41
Tableau 6. Lieux et dates de récolte des différentes plantes étudiés .....	87
Tableau 7. Rendement d'extraction des huiles essentielles .....	91
Tableau 8. Évaluation de l'activité antibactérienne des différentes huiles essentielles .....	92
Tableau 9. Caractérisation chimique par GC/MS des composés de l'huile essentielle d'achillée millefeuille .....	94
Tableau 10. Caractérisation chimique par GC/MS des composés de l'huile essentielle de comptonie voyageuse .....	96
Tableau 11. Caractérisation chimique par GC/MS des composés de l'huile essentielle de cèdre .....	98
Tableau 12. Caractérisation chimique par GC/MS des composés de l'huile essentielle de thé du Labrador .....	100
Tableau 13. Caractérisation chimique par GC/MS des composés de l'huile essentielle de myrique baumier .....	101
Tableau 14. Caractérisation chimique par GC/MS des composés de l'huile essentielle de pin blanc .....	104

## CHAPITRE 1

### PROBLÉMATIQUE ET OBJECTIFS

## **1.1 Problématique**

La région du Saguenay Lac-Saint-Jean couvre une superficie de 106 000 km<sup>2</sup>, dont 85 688 km<sup>2</sup> sont couverts de forêts, ce qui en fait l'un des plus grands territoires forestiers du Québec (Gauthier & Laliberté, 2011). Considérant les divers emplois se rattachant au secteur sylvicole, l'industrie forestière occupe une place importante dans l'économie de cette région (Lachance, 2012). Cependant, le secteur forestier ainsi que les emplois connexes ont été grandement fragilisés par le contexte économique des dernières années (Gauthier & Laliberté, 2011). Il est également pertinent de mentionner que la forêt possède de nombreuses ressources méconnues ou encore inexploitées. Les produits forestiers non ligneux (PFNL) offrent un potentiel intéressant en ce qui a trait à la diversification du secteur industriel forestier. Les huiles essentielles sont intéressante du point de vue économique, principalement pour le secteur des produits pharmaceutiques, cosmétiques et nutraceutiques puisque leurs activités biologiques sont diversifiées et recherchées sur le marché (Turgeon, 2003). À elles seules, les huiles essentielles pourraient générer des retombées économiques de près de 1M\$ pour la région (Turgeon, 2003).

Depuis les années 80, les résistances aux antibiotiques commerciaux se font de plus en plus importantes au Québec et ailleurs dans le monde (Starr & Reynolds, 1951). L'utilisation de ceux-ci comme facteurs de croissance a été ciblée comme une des causes du développement de ces résistances acquises (Aarestrup, 1999; Starr & Reynolds, 1951). Depuis l'introduction dans les années 50 des antibactériens

utilisés comme promoteurs de croissance des résistances sont apparues successivement pour les tétracyclines (1963), les érythromycines (1967), la pénicilline (1967) et le chloramphénicol (1970) (Geslin *et al.*, 1994). L'élimination des antibiotiques commerciaux de la nourriture animale réduirait considérablement les résistances bactériennes acquises contre ceux-ci (Burt, 2004). D'un autre côté, l'utilisation des antibiotiques ajoutés à la nourriture animale permet d'améliorer la vitesse de croissance et l'indice de consommation des animaux (Corpet, 2000). C'est pourquoi la substitution des antibiotiques commerciaux utilisés comme promoteurs de croissance est plus adéquat que l'élimination.

Les huiles essentielles sont utilisées depuis longtemps pour leurs caractéristiques organoleptiques, mais également pour leur propriété antimicrobienne. Par exemple, les huiles extraites du thym (*Thymus vulgaris*), de l'origan (*Origanum vulgare*), du clou de girofle (*Syzygium aromaticum*) et du poivre noir (*Piper nigrum*) présentent toutes une forte activité antibactérienne (Dorman & Deans, 2000). De plus, certains composés isolés de ces huiles essentielles, tels que le thymol et le carvacrol (deux phénols monoterpéniques) sont, eux aussi, reconnus comme étant actifs. Bien que certaines huiles essentielles issues de plantes de la forêt boréale soient antibactériennes, telle que l'huile essentielle de *Abies balsamea*, la grande majorité n'a pas encore été étudiée (Pichette *et al.*, 2006).

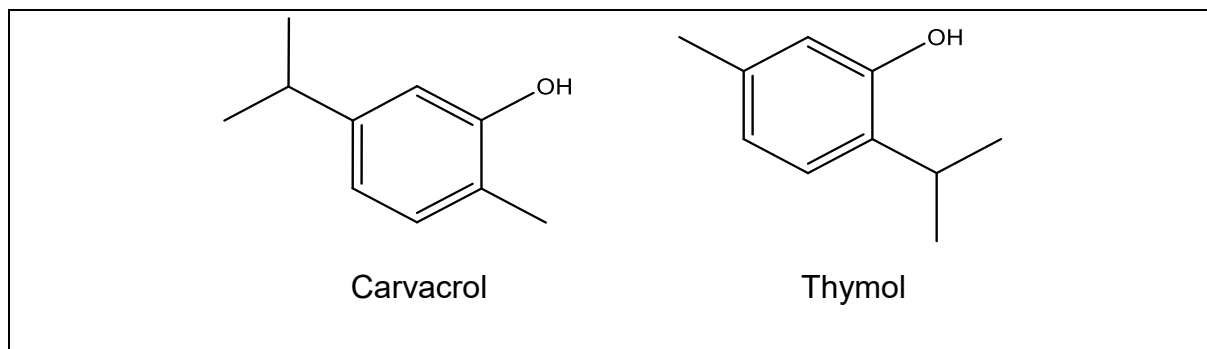


Figure 1. Structure chimique de deux composés antibactériens retrouvés dans certaines huiles essentielles dont *Thymus vulgaris*.

La nécessité de trouver de nouveaux traitements antibactériens pour la substitution des antibiotiques commerciaux utilisés comme promoteurs de croissance combinée au potentiel qu'offre la forêt boréale ainsi qu'aux avantages économiques pour le Saguenay Lac-Saint-Jean ont amené les chercheurs du laboratoire LASEVE à entreprendre ce projet de recherche. Les travaux présentés dans ce mémoire s'inscrivent dans un projet plus vaste visant à évaluer le potentiel de plusieurs huiles essentielles de la forêt boréale en tant que promoteurs de croissance.

Lors de la réalisation de ce mémoire de maîtrise, un criblage biologique (évaluation du potentiel antibactérien) et chimique des huiles essentielles de 17 plantes de la forêt boréale a été réalisé. La sélection des diverses plantes a été effectuée en fonction de divers critères, dont les principaux sont l'usage en médecine traditionnelle et la méconnaissance scientifique de l'activité biologique et/ou de la composition chimique de l'huile essentielle. Le criblage a été pratiqué sur *Achillea millefolium* L. (1), *Agrimonia striata* Michx (2), *Aralia nudicaulis* L. (3),

*Arctium lappa* L. (4), *Comptonia peregrina* (L.) Coulter (5), *Empetrum nigrum* L. (6), *Epilobium angustifolium* L. (7), *Ledum groenlandicum* Retzius (8), *Myrica gale* L. (9), *Pinus strobus* L. (10), *Populus tremuloides* Michx. (11), *Plantago major* L. (12), *Prunus virginiana* L.f. (13), *Rhus typhina* L. (14), *Tanacetum vulgare* L. (15) *Thuja occidentalis* L. (16) et *Tussilago farfara* L. (17). Cette partie des travaux, réalisée en début de maîtrise, a été effectuée afin de sélectionner les espèces végétales qui feraient l'objet de la suite du projet. L'huile essentielle de *T. farfara* s'est démarquée des autres huiles obtenues par sa composition chimique peu commune et parce qu'à notre connaissance, aucune étude n'a porté sur son activité antibiotique. L'huile de *T. vulgare*, quant à elle, s'est avérée intéressante puisque sa composition chimique est très diversifiée, selon le chémotype, et qu'aucune étude ne s'est intéressée aux liens entre l'activité antibactérienne et la composition chimique.

## **1.2 Objectifs**

### **1.2.1 Objectif principal**

- Étudier la composition chimique et l'activité antibactérienne d'huiles essentielles de plantes de la forêt boréale.

### 1.2.2 Sous-objectifs

- Extraire, par entraînement à la vapeur, les huiles essentielles d'*Achillea millefolium* L. (1), *Agrimonia striata* Michx (2), *Aralia nudicaulis* L. (3), *Arctium lappa* L. (4), *Comptonia peregrina* (L.) Coulter (5), *Empetrum nigrum* L. (6), *Epilobium angustifolium* L. (7), *Ledum groenlandicum* Retzius (8), *Myrica gale* L. (9), *Pinus strobus* L. (10), *Populus tremuloides* Michx. (11), *Plantago major* L. (12), *Prunus virginiana* L.f. (13), *Rhus typhina* L. (14), *Tanacetum vulgare* L. (15) *Thuja occidentalis* L. (16) et *Tussilago farfara* L. (17).
- Caractériser chimiquement les huiles essentielles obtenues par chromatographie gazeuse.
- Évaluer le potentiel antibactérien des huiles essentielles sur *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli*.
- Sélectionner deux huiles essentielles sur les bases de l'absence de connaissance scientifique, la composition chimique et l'activité antibactérienne contre *S. aureus* et *E. coli*.
- Identifier pour ces deux espèces (*T. farfara* et *T. vulgare*) les composés qui sont en partie responsable de l'activité antibactérienne des huiles essentielles sur les deux souches bactériennes testées.

## CHAPITRE 2

### ÉTAT DES CONNAISSANCES



## **2.1 Les Résistances bactériennes**

Les bactéries pathogènes sont responsables de plusieurs infections indésirables chez l'homme. C'est pourquoi les antibiotiques, découverts en bonne partie entre les années 1930 et 1970, ont révolutionné le monde de la médecine (Bush, 2004). En effet, les molécules antibactériennes, qu'elles soient d'origine naturelle, semi-synthétique ou synthétique, se sont montrées efficaces et indispensables. En agissant de manière bactéricide ou bactériostatique, ces molécules peuvent traiter, contrôler et prévenir les infections bactériennes. Sur les humains, elles permettent la défense contre de très nombreuses maladies infectieuses telles que le choléra, la lèpre, le tétanos, la tuberculose, le typhus, la gonorrhée et la syphilis (Campbell & Reece, 2007).

Par contre, il est connu que l'utilisation accrue, prolongée, inappropriée ou à des doses sous-thérapeutiques des antibiotiques peut représenter un ensemble de facteurs de risque d'apparition de résistance bactérienne (Phillips *et al.*, 2004). En effet, les bactéries ciblées par des agents antimicrobiens possèdent la capacité d'y devenir résistantes.

Dans ce contexte, des lignées antibiorésistantes aux molécules commercialement utilisées dans la nutrition animale apparaissent régulièrement (Aarestrup, 1999). Dans ce type de traitement, les animaux reçoivent des antibiotiques à dose sous-thérapeutique (environ 20 ppm), et ce, durant la majeure partie de leur vie (Corpet, 2000). Les bactéries ont donc un contact prolongé avec ce type de molécules et la dose administrée ne permet pas d'éliminer toutes les

bactéries. Ainsi et au fil du temps, certains micro-organismes développent des résistances.

Malgré les inconvénients que présente cette forme d'utilisation des antibiotiques, plusieurs avantages sont observés dans l'industrie de production alimentaire, tels que l'amélioration de la vitesse de croissance et de l'indice de consommation des animaux (Corpet, 2000).

## **2.2 Les huiles essentielles utilisées comme promoteurs de croissance**

Le remplacement des antibiotiques commerciaux utilisés comme promoteurs de croissance est nécessaire et il est envisagé de les substituer par une alternative ayant un mécanisme similaire. Les huiles essentielles et leurs métabolites secondaires pourraient être intéressants plusieurs d'entre elles ont des activités bactéricides et bactériostatiques (Bakkali *et al.*, 2008).

De plus, certaines huiles essentielles, tels que celles extraite de *Thymus vulgaris* et *Origanum vulgare* se sont montrées pouvoir améliorer les propriétés de la nourriture animale, le rendement de la production ainsi que la qualité des aliments dérivés de ces animaux (Windisch *et al.*, 2008). L'appétence de la nourriture et la digestion peuvent également être augmentées par celles-ci (Langhout, 2000; William & Losa, 2001). Les modes d'actions restent cependant incompris puisqu'il s'agit d'une classe relativement nouvelle d'additifs alimentaires.

Les propriétés antioxydantes (Bakkali *et al.*, 2008), anti-inflammatoires (Bakkali *et al.*, 2008) et hypocholestérolémiques (Craig, 1999) que possèdent certaines huiles essentielles sont également d'intérêt pour le domaine. Elles peuvent toutes permettre d'améliorer la qualité des produits dérivés des animaux d'élevages.

## **2.3 Les huiles essentielles**

### **2.3.1 Les procédés d'extraction**

Les huiles essentielles sont obtenues lors de l'extraction de divers types de matières végétales contenant des molécules aromatiques et volatiles. L'extraction est généralement obtenue par une distillation avec la vapeur d'eau. Celle-ci libère des substances renfermées dans les glandes de la plante, à des températures plus basses que leur propre point d'ébullition grâce à la contribution de la pression partielle de la vapeur d'eau. L'huile essentielle est habituellement un liquide concentré, plus ou moins visqueux, parfois coloré et hydrophobe. Elle possède une densité généralement inférieure à celle de l'eau et un indice de réfraction élevé (Bruneton, 2009).

Les sources de matière végétale utilisée pour l'extraction des huiles essentielles sont très variées. Elles peuvent être obtenues de fleurs, de feuilles, de fruits, d'écorces, du bois, de graines, de racines ou de rhizomes de diverses espèces.

La distillation sèche, l'extraction par pression à froid, l'hydrodistillation par micro-ondes sous-vide et la distillation sont des méthodes d'extractions utilisées pour obtenir de telles substances. Ces méthodes sont diversifiées et influencent le rendement et la composition chimique de l'huile essentielle (Bruneton, 2009).

- I. Pour certaines plantes, les huiles essentielles sont obtenues par distillation sèche. Cette technique consiste à chauffer à basse température le matériel végétal sans ajout d'eau ni de solvants organiques, puis à condenser les substances volatiles. Cette technique d'extraction est caractéristique des matières fragiles telles que les pétales de rose (Lucchesi, 2005).
- II. L'extraction par pression à froid consiste à extraire par pression mécanique les composés aromatiques des fruits de *citrus*, et ce, sans chauffage (Bruneton, 2009).
- III. L'hydrodistillation par micro-ondes sous-vide est une technique dans laquelle le matériel végétal est disposé dans un assemblage clos où il sera chauffé par micro-ondes. L'eau contenue dans les plantes est alors transformée sous forme de vapeur et entraîne l'huile essentielle. Celle-ci est ensuite récupérée à l'aide d'un procédé classique de refroidissement des vapeurs d'eau et de décantation. Une étude comparative réalisée par Lucchesi *et al.* (2004) a montré que l'extraction des huiles essentielles faite par micro-ondes pendant 30 minutes était quantitativement (rendement) et qualitativement (profil aromatique) similaire à celle obtenue par des techniques classiques d'hydrodistillation d'une durée de 4,5 heures. L'huile essentielle extraite

contient toutefois une plus grande quantité de composés oxygénés puisque les dégradations thermiques et hydrolytiques de ces composés sont limitées. Cette méthode permet donc des économies de coûts, en termes de temps et d'énergie.

- IV. La distillation est le principe d'extraction le plus utilisé pour l'entraînement des substances aromatiques. La méthode est basée sur l'existence d'un azéotrope de température d'ébullition inférieur aux points d'ébullition de l'eau et de l'huile essentielle. Les composés aromatiques sont entraînés par vapeur d'eau sous une température inférieure à 100 °C (Franchomme & Pénoël, 1990). Il existe plusieurs procédés utilisant ce principe.
- a. L'hydrodistillation qui consiste à immerger le matériel végétal dans l'eau et à placer le tout sous une source de chaleur. Les vapeurs d'eau vont alors entraîner l'huile essentielle. Celle-ci est ensuite récupérée par condensation de l'eau et différence de densité (l'huile essentielle flotte généralement sur l'eau).
  - b. La distillation par entraînement à la vapeur d'eau est un procédé dans lequel le matériel végétal ne macère pas dans l'eau. Il est plutôt placé sur un grillage au travers duquel passe la vapeur d'eau ou dans un contenant dans lequel la vapeur d'eau circule. Les cellules végétales sont endommagées par celle-ci en raison de sa température élevée. Les composés volatils sont alors libérés et entraînés vers le réfrigérant au contact duquel les vapeurs sont condensées et l'huile récupérée

par différence de densité. Avec cette méthode, les altérations hydrolytiques sont diminuées comparativement à l'hydrodistillation.

- c. L'hydrodiffusion consiste à faire passer un courant de vapeur d'eau de haut en bas et à pression élevée à travers une matrice végétale. Cette méthode est plus rapide, ce qui amène moins de détérioration des composés comparativement aux deux précédentes méthodes de distillation. Cependant, l'huile essentielle ainsi obtenue contient des composés non volatils; c'est pourquoi ce type d'extrait se nomme «essence de percolation» (Franchomme & Péroël, 1990).

### **2.3.2 La composition chimique des huiles essentielles**

Otto Wallach fut le premier à s'intéresser à la composition chimique des huiles essentielles (Teisseire, 1991). Il publia, en 1884, un premier article décrivant 9 terpènes retrouvés dans des huiles essentielles. Depuis, le nombre d'articles qui traitent de la composition chimique de ce type d'extraits afflue dans la littérature scientifique.

Une huile essentielle est un mélange complexe de composés pouvant contenir plus de 300 molécules distinctes (majoritairement des molécules volatiles) (Sell, 2006). Plusieurs familles de composés sont toutefois caractéristiques de ce type de produit naturel et sont décrites ci-dessous.

- I. Les terpénoïdes volatils, c'est-à-dire ceux dont la masse moléculaire n'est pas trop élevée, soit entre 120 et 250 g/mol, tels que a) des monoterpènes, b) des sesquiterpènes et c) des diterpènes :
  - a) Les monoterpènes peuvent composer jusqu'à 90% d'une huile essentielle (ex. : myrcène,  $\beta$ -pinène,  $\alpha$ -terpinène) (Bruneton, 2009). Composés de 10 atomes de carbone, ils peuvent être acycliques (ex. : myrcène), monocycliques (ex. :  $\alpha$ -terpinène) ou bicycliques (ex. : pinènes). En plus de posséder une grande variété de structures, ils peuvent avoir plusieurs fonctions qui y sont greffées (ex. : carbure, alcool, aldéhyde, ester, éther, cétone, phénol, etc.) (Bakkali *et al.*, 2008; Burt, 2004).
  - b) Les sesquiterpènes sont également très présents dans l'huile essentielle et peuvent composer la majeure partie de ce type d'extrait (ex. :  $\beta$ -caryophyllène,  $\alpha$ -humulène,  $\beta$ -bisabolène). Les fonctions de ce type de molécules sont similaires à celles des monoterpènes, mais l'extension de la chaîne carbonée permet une plus grande variété de cyclisations, de réarrangements et d'oxydations (Bakkali *et al.*, 2008).
  - c) Exceptionnellement, quelques diterpènes peuvent être présents dans l'huile essentielle (ex. : labdane) (Vila *et al.*, 2002).
- II. En moins grande concentration, il y a des composés aromatiques dérivés du phénylpropane (ex. : eugénol, vanilline, anéthole). Ces types de

composés sont, en général, des allylphénols, des propénylphénols et des coumarines (Bruneton, 2009).

- III. Divers produits issus du processus de dégradation de terpènes non volatils ou d'acide gras (en général des composés aliphatiques) (ex. : acide laurique et damascone) (Bruneton, 2009).

Chacune des molécules retrouvées dans l'huile essentielle a sa propre identité, c'est-à-dire sa propre structure moléculaire et sa propre activité biologique. Une huile essentielle contient de nombreuses molécules chimiques. Connaître la composition ainsi que la concentration des composés retrouvés dans les huiles essentielles permet de mieux prédire et comprendre l'activité biologique d'une huile.

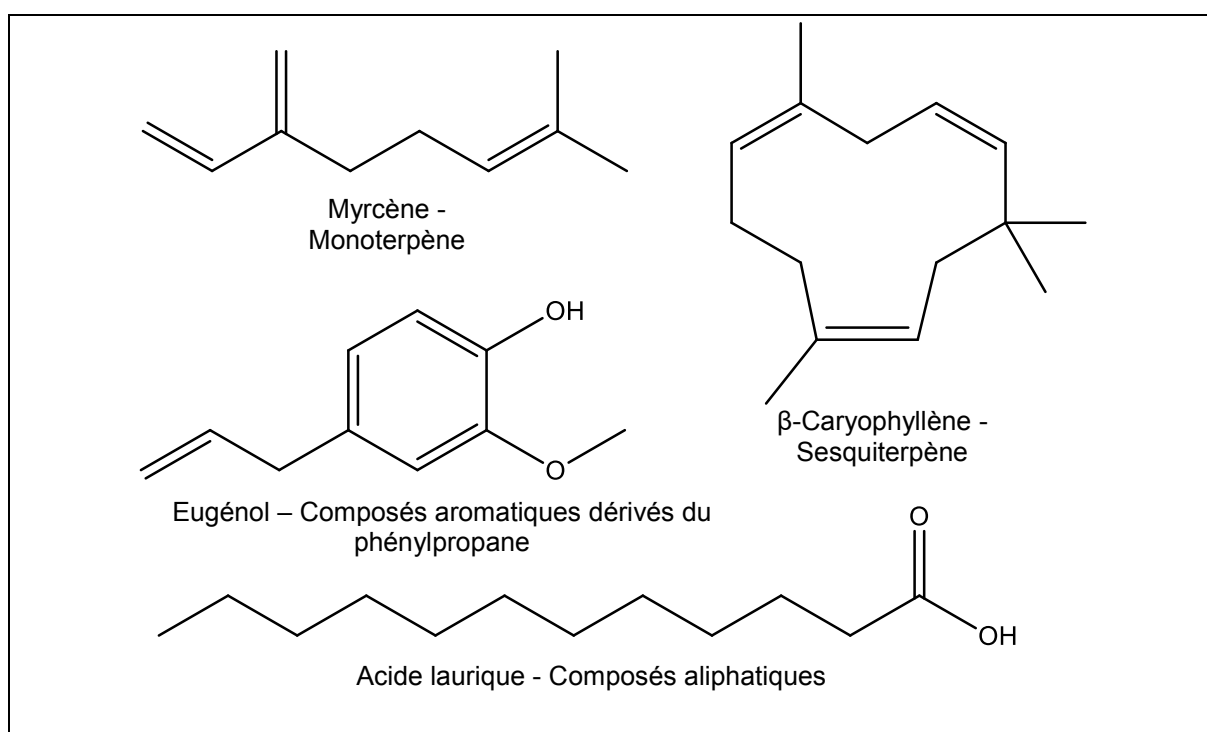


Figure 2. Exemples de composés retrouvés dans les huiles essentielles



### 2.3.3 Toxicité des huiles essentielles

Les huiles essentielles sont des produits naturels, mais qui dit naturel ne veut pas dire sans danger. En effet, plusieurs huiles sont reconnues pour être irritantes pour la peau (huiles riches en thymol ou carvacrol), être allergènes (huiles riches en cinnamaldéhyde), phototoxiques (huiles contenant des furocoumarines) et même neurotoxiques (les huiles contenant une forte quantité de  $\alpha$ -thujone) (Piochon, 2008; Bruneton, 2009). Il est donc important de connaître la composition chimique des huiles essentielles pour déterminer si des molécules indésirables s'y retrouvent. À titre d'exemple, au Québec l'huile essentielle de cèdre (*Thuja occidentalis*) est reconnue pour contenir une grande quantité de thujones (Simard *et al.*, 1988).

### 2.3.4 Variation dans la composition des huiles essentielles : chemotypes

Certaines huiles essentielles provenant d'une même espèce de plantes présentent des profils chimiques ou chémotypes différents. D'un point de vue botanique, ces plantes sont semblables. Pourtant, les analyses chimiques montrent des variations très importantes dans la composition en métabolites secondaires. Un exemple bien connu est celui du thym, qui présente 6 sortes de chémotypes différents après analyse de l'huile essentielle (Thompson *et al.*, 2003). La différence majeure réside dans le monoterpène majoritaire qui peut être soit le géraniol, l' $\alpha$ -terpinéol, le thuyanol-4, le linalool, la carvacrol ou le thymol.

Une gamme de facteurs externes peuvent expliquer ces modifications dans la composition chimique d'une huile essentielle, tels que le taux d'humidité, la température, la durée d'ensoleillement, la composition du sol, la période de récolte et la fraîcheur du matériel végétal récolté (Bruneton, 2009). À titre d'exemple, la concentration en  $\beta$ -caryophyllène et en  $\beta$ -sélinène augmentent en fonction de la durée d'ensoleillement alors qu'à l'inverse le carvacrol et le p-cymène décroissent (Yayi-Ladekan *et al.*, 2012). Plusieurs variations dans la composition de l'huile essentielle peuvent être également induites en fonction des parties de la plante extraites, de la technique d'extraction et du temps d'extraction (Belleau & Collin, 1993).

En plus de modifier la composition chimique, tous les facteurs précédemment énoncés peuvent influencer la teneur en huile essentielle. À titre d'exemple, le rendement d'extraction de celle-ci augmente chez les *Citrus* lorsque la température est élevée (Bruneton, 2009). Le rendement d'extraction des feuilles d'*Ocimum canum* est également influencé par le temps et la durée d'ensoleillement subi par la plante (Yayi-Ladekan *et al.*, 2012).

### **2.3.5 Activités biologiques des huiles essentielles**

Les vertus thérapeutiques des huiles essentielles ont été découvertes depuis bon nombre d'années. À des époques différentes, certaines huiles essentielles ont permis, par diffusion, d'assainir l'air et ont été efficaces pour contrôler la propagation

de maladies graves telles que la peste, dans la Grèce antique, et plus tard le choléra par les parfumeurs de Paris et de Londres (Manou *et al.*, 1998). Elles ont largement été utilisées pour leurs propriétés antibactériennes, antifongiques, antiseptiques, antimicrobiennes, antioxydantes et anti-inflammatoires (Miguel, 2010; Bakkali *et al.*, 2008).

Ce ne sont pas tous les composés de l'huile essentielle qui possèdent une activité biologique. Ce sont quelques molécules, souvent majoritairement présentes dans celle-ci, qui explique l'activité. Certains composés minoritaires présents dans les huiles essentielles peuvent également agir de manière synergique avec d'autres composés actifs (Burt, 2004).

#### *2.3.5.1 Activité antibactérienne des huiles essentielles*

L'activité antibactérienne des huiles essentielles et les composés qu'elles contiennent sont abondamment documentés dans la littérature scientifique. Les huiles essentielles hautement actives sont souvent riches en composés phénoliques (ex. : eugénol, thymol, carvacrol) (Bruneton, 2009). Cependant, d'autres familles de molécules présentent aussi des propriétés antibactériennes intéressantes :

- I. les alcools, les aldéhydes et les cétones monoterpéniques (ex. : géraniol, menthol, terpinéol, myrcénol, citronellal, thujone, camphre, carvone, etc.),
- II. des phénylpropanes (ex. : cinnamaldéhyde),
- III. et des monoterpènes (ex. :  $\gamma$ -terpinène, *p*-cymène) (Bruneton, 2009).

L'activité antibactérienne observée s'explique souvent par quelques composés antibactériens retrouvés dans ce type d'extrait (Bothelo *et al.*, 2007; Burt, 2004). Ces composés peuvent pénétrer la paroi cellulaire et la membrane cytoplasmique des bactéries en raison de leur caractère lipophile (Bakkali *et al.*, 2008). Ils vont ainsi perturber la structure des différentes couches phospholipides, de polysaccharides et d'acides gras (Bakkali *et al.*, 2008; Knoblocha *et al.*, 1989; Lambert *et al.*, 2001). Chez les bactéries, la perte de perméabilité des membranes est associée à une perte d'ions, à la réduction du potentiel de membrane, à l'effondrement de la pompe à protons ainsi qu'à l'appauvrissement des réserves d'ATP (Bakkali *et al.*, 2008).

## **2.4 Les plantes étudiées**

Les Premières Nations du Canada ainsi que les colons Français immigrés dans le Nouveau Monde au 18<sup>e</sup> siècle ont utilisé des centaines d'espèces végétales comme plantes médicinales, ce qui suggère que plusieurs d'entre elles renferment des agents pharmacologiques efficaces (Marie-Victorin, 1995; Arnason *et al.*, 1981; Moerman, 1998). C'est pourquoi il semblait intéressant de s'attarder à l'analyse des activités antibactériennes des huiles essentielles de plantes issues la forêt boréale. Dans ce contexte, un criblage a été effectué sur 17 plantes de la forêt boréale utilisées à des fins médicinales: *Achillea millefolium* L. (1), *Agrimonia striata* Michx (2), *Aralia nudicaulis* L. (3), *Arctium lappa* L. (4), *Comptonia peregrina* (L.) Coulter (5), *Empetrum nigrum* L. (6), *Epilobium angustifolium* L. (7), *Ledum*

*groenlandicum* Retzius (8), *Myrica gale* L. (9), *Pinus strobus* L. (10), *Populus tremuloides* Michx. (11), *Plantago major* L. (12), *Prunus virginiana* L.f. (13), *Rhus typhina* L. (14), *Tanacetum vulgare* L. (15) *Thuja occidentalis* L. (16) et *Tussilago farfara* L. (17).

Le tussilage (*T. farfara*) et la tanaïsie vulgaire (*T. vulgare*) ont été sélectionnés pour faire l'objet de la présente étude. L'huile essentielle de *T. farfara* s'est démarquée des autres huiles obtenues par sa composition chimique peu commune, en plus d'être peu documentée dans la littérature scientifique. De plus, à notre connaissance, aucune étude n'a porté sur l'analyse de son activité antibiotique. L'huile de *T. vulgare*, quant à elle, s'est avérée intéressante puisque sa composition chimique est très diversifiée selon le chémotype et qu'aucune étude ne semble s'être intéressée aux liens entre l'activité antibactérienne et la composition chimique.

### 2.4.1 Tussilage (*Tussilago farfara* L.)

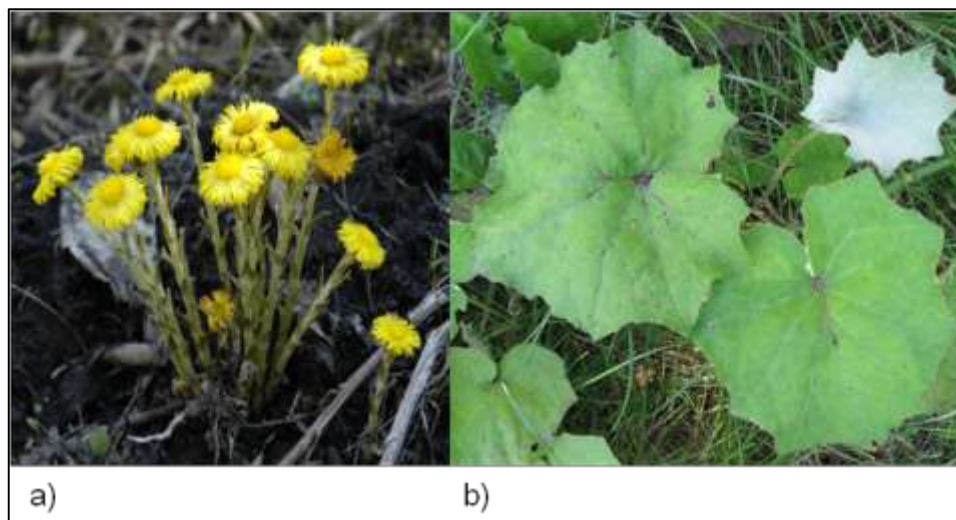


Figure 3. Fleurs (a) et feuilles (b) de *Tussilago farfara*  
(Répertoire Québec Nature, 2013)

#### 2.4.1.1 Description physique

Le tussilage est une plante vivace de la famille des *Asteraceae* qui produit des rhizomes (Marie-Victorin *et al.*, 2002). Les fleurs sont produites à l'automne. Elles passent l'hiver dans le sol et éclosent lors des premières journées ensoleillées du printemps. Les fleurs sont des capitules jaunes et solitaires dressées sur une tige couverte de poils cotonneux et munies d'écailles. Les fleurs jaunes sont souvent confondues avec les *Taraxacum*, communément appelés pissenlits. Après la floraison, les tiges se courbent et se redressent lorsque les akènes, munis d'aigrette, sont prêts à être distribués. Les feuilles, pouvant atteindre jusqu'à 20 cm de

diamètre, poussent après la floraison. Elles sont basales, pétiolées et polygonales, montrant un feutrage blanc à la face inférieure et un vert clair sur la face supérieure.

#### *2.4.1.2 Distribution géographique*

Le tussilage est une plante commune en Europe, en Asie, en Amérique du Nord et en Amérique du Sud (Chanaj-kaczmarek *et al.*, 2013). Elle apprécie les sols incultes, constitués de limon ou d'argile, pauvres en humus, récemment créés ou bouleversés (Marie-Victorin, 1995).

#### *2.4.1.2 Activités biologiques*

Les recherches scientifiques ont montré que plusieurs extraits provenant des feuilles, des bourgeons et des fleurs ainsi que certaines molécules isolées de ces derniers sont antitussifs, antidiabétiques, anti-inflammatoires et antioxydants (Hirono *et al.*, 1976; Hwangbo *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2006; Y. Li & Wang, 1988; Ryu *et al.*, 1999). Certains sont également reconnus pour avoir des effets neuroprotecteurs en plus de posséder des effets stimulants sur le système cardiovasculaire (Y. Li & Wang, 1988; Cho *et al.*, 2005). À notre connaissance, aucune étude ne fait mention de l'activité biologique de l'huile essentielle de *T. farfara*.

#### 2.4.1.2.1 Activité antitussive

Les colons d'origine française installés en Amérique du Nord, les Européens ainsi que les Orientaux ont utilisé la fumée des feuilles pour le traitement des infections pulmonaires (Marie-Victorin, 1995; Bruneton, 2009). Pour traiter la toux et la tuberculose, les Amérindiens, quant à eux, utilisaient une infusion des racines (Arnason, 1981; Moerman, 1998). Jusqu'à ce jour, l'infusion des feuilles de la plante est reconnue comme officinale, en Allemagne, pour traiter la toux, l'inflammation des muqueuses buccales et du larynx (Bruneton, 2009). C'est la forte concentration en acide chlorogénique, en acide 3,5-dicaféoylquinique et en rutine qui est liée à l'activité antitussive et expectorante de la plante (Z.-Y. Li *et al.*, 2012).

#### 2.4.1.2.2 Potentiel antidiabétique

L'extrait éthanolique des bourgeons a montré un potentiel dans le traitement du diabète de type II ( $IC_{50} = 86,2 \mu\text{g/ml}$ ) en inhibant une enzyme impliquée dans la synthèse des triglycérides dans l'organisme; diacylglycérol acyltransférase (DGAT). La tussilagone serait en partie responsable de cette activité avec une concentration inhibant 50% de l'activité de l'enzyme ( $IC_{50}$ ) de  $18,8 \mu\text{M}$ . Toujours dans la même perspective, l'extrait éthanolique des bourgeons inhibe 68% de l'enzyme  $\alpha$ -glucosidase lors d'un criblage (Gao *et al.*, 2008). Plusieurs composés isolés d'un extrait méthanolique ( $IC_{50} = 1 \text{ mg/ml}$ ) (acide 3,4-dicaféoylquinique, acide 3,5-dicaféoylquinique, acide 4,5-dicaféoylquinique et rutine) ont été testés pour



connaître leur effet inhibiteur sur cette même enzyme (Gao *et al.*, 2008). L'acide 4,5-dicaféoylquinique a démontré la plus forte activité avec une IC<sub>50</sub> de 0,89 mM.

#### 2.4.1.2.3 Activité anti-inflammatoire

L'activité anti-inflammatoire de la plante a été démontrée dans le cadre de plusieurs travaux (Ryu, Jeong, & Sohn, 1999; Hwangbo *et al.*, 2009; W. Li, Huang, & Yang, 2012; Hwang *et al.*, 1987). Plus précisément, la tussilagone, un sesquiterpène isolé des fleurs de *T. farfara*, est anti-inflammatoire par inhibition de la production d'oxyde nitrique (NO) et des prostaglandines E2 (PGE2) ainsi que par l'expression de l'inductible oxyde nitrique synthase (iNOS) et cyclo-oxygénase de type 2 (COX-2) dans des macrophages (Lim, Lee, & Ryu, 2008; Hwangbo *et al.*, 2009). Plusieurs autres sesquiterpènes, isolés d'un extrait éthanolique des bourgeons de *T. farfara*, sont inhibiteurs de la production de NO de façon dose-dépendante lors d'analyses sur les macrophages stimulés avec le lipopolysaccharide bactérien gram négatif (LPS) (W. Li *et al.*, 2012). Le 7β-(4-méthylsénécioyloxy)-oplopa-3(14)E,8(10)-diène-2-one est le composé le plus actif avec une IC<sub>50</sub> de 10,80 μM. L'extrait éthanolique des fleurs de *T. farfara* a permis l'isolation de douze autres sesquiterpènes anti-inflammatoires sur l'inhibition du NO induit par la LPS sur des macrophages (W. Li *et al.*, 2012). Le composé nommé 7β-(4-méthylsénécioyloxy)-oplopa-3(14)E,8(10)-diène-2-one est celui qui a montré le meilleur potentiel avec une IC<sub>50</sub> de 10,80 μM. De plus, un bisabolène présentant une fonction époxyde isolé de *T. farfara* s'est également avéré anti-inflammatoire (Ryu

*et al.*, 1999). Il inhibe 71,1 % de la synthèse du NO produit par les macrophages stimulés avec le LPS. Toujours dans la même voie, le 14-acétoxy-7 $\beta$ -(3-éthylcrotonoyloxy)-notonipétranone, isolé à partir des extraits au dichlorométhane des bourgeons de *T. farfara*, inhibe le facteur d'activation des plaquettes (PAF) et l'entrée du calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) dans les vésicules membranaires, lesquelles sont des facteurs pro-inflammatoires (Hwang *et al.*, 1987).

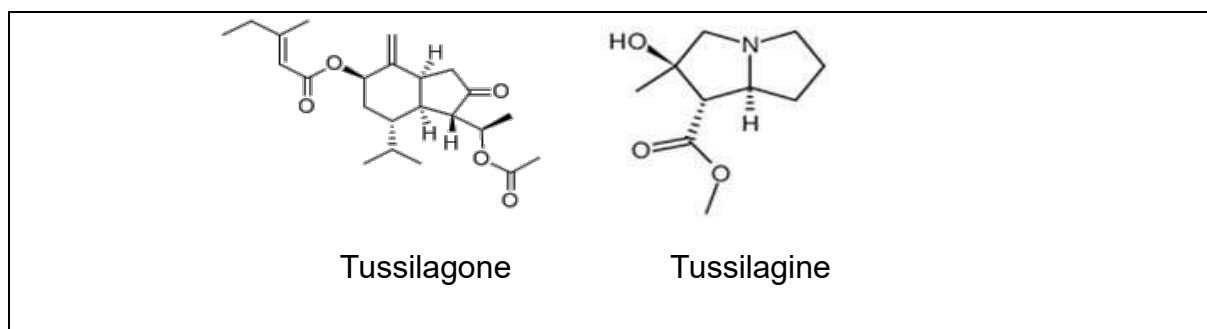


Figure 4. Principaux composés actifs isolés de *T. farfara*

#### 2.4.1.2.4 Neuroprotecteur

Une étude réalisée sur cette plante par Cho *et al.* (2005) a permis de démontrer que l'extrait à l'acétate d'éthyle des bourgeons floraux est un puissant inhibiteur des lésions neuronales induites par l'acide arachidonique. Il atténue également les dommages neuronaux causés par la spermine NONOate, un générateur de NO.

#### 2.4.1.2.5 Activité antioxydante

Un fractionnement guidé par l'activité antioxydante de l'extrait réalisé avec de l'acétate d'éthyle à partir des bourgeons de fleurs de *T. farfara* a permis l'isolation de deux flavonoïdes : la quercétine 3-*O*- $\beta$ -*L*-arabinopyranoside ( $17 \pm 1$  nmole/mg protéine) et la quercétine 3-*O*- $\beta$ -*D*-glucopyranoside ( $16 \pm 1$  nmole/mg protéine) (Kim *et al.*, 2006). Ces deux molécules glycosylées présentent une activité antioxydante intéressante et plus élevée que leur aglycone ( $20 \pm 1$  nmole/mg protéine). Cette même fraction s'est également révélée inhiber la peroxydation des lipides (Cho *et al.*, 2005).

#### 2.4.1.2.6 Stimulant cardiovasculaire

La tussilagone a la propriété pharmacologique de stimuler les battements cardiaques de plusieurs mammifères, dont la souris, le rat, le chien et le chat (Y. Li & Wang, 1988).

#### 2.4.1.2.7 Toxicité

Depuis bon nombre d'années les feuilles du tussilage sont reconnues comme étant toxiques en raison des alcaloïdes pyrrolizidine présents dans cette partie de la plante (Chanaj-kaczmarek *et al.*, 2013; Bruneton, 2009). C'est en 1976 que le groupe de Hirono *et al.* ont démontré les propriétés cancérigènes du tussilage grâce à une étude effectuée sur des rats. La senkirkine, un alcaloïde de type pyrrolizidine serait responsable.

#### 2.4.1.2.8 Activité antibactérienne

Peu d'études traitent de l'activité antibactérienne de la plante. Deux études réalisées avec des extraits 80% éthanol montrent une activité contre des bactéries Gram positif soit *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus* (MIC<sub>90</sub> = 15,6 mg/ml), *Staphylococcus aureus* (MIC<sub>90</sub> = 62,5 mg/ml) et Gram négatif soit *Escherichia coli* (Izzo *et al.*, 1995; Kokoska *et al.*, 2002). L'extrait méthanolique s'est également avéré actif contre *Staphylococcus aureus* et *Bacillus cereus* en produisant des cercles d'inhibition de 10 à 14 mm lors d'essais sur disques (Bonjar, 2004).

#### 2.4.1.3 Composition chimique

Plusieurs articles émanant majoritairement d'Asie ont rapportés l'identification de composés dans le tussilage. Les principales familles de composés identifiées sont présentées dans le tableau 1.

Tableau 1. Exemple de composés identifiés dans différents extraits de *T. farfara*

Familles de composés	Exemples de composés identifiés	Références
Sesquiterpènes	Tussilagone	(Aoita <i>et al.</i> , 1999; Liu <i>et al.</i> , 2011; Wang <i>et al.</i> , 2011)
	Tussilagonone	
	14-acétoxy-7β-(3'-éthyl <i>cis</i> -crotonoyloxy)- 1α-(2'-méthylbutyryloxy)-notonipétranone	
	7β-(3'-éthyl <i>cis</i> -crotonoyloxy)-1α-(2'-méthyl butyryloxy)-3,14-déhydro-Z- notonipétranone)	
Triterpènes	Bauer-7-ène-3β,16α-diol	(Hooper & Chandler, 1984; Aoita & Kikuchi, 1998)
	Bauerénol	
	Isobauerénol	

Familles de composés	Exemples de composés identifiés	Références
Composés phénoliques acides	Acide caféique et ses dérivés	(Chanaj-kaczmarek <i>et al.</i> , 2013; Gao <i>et al.</i> , 2008; Adamczak <i>et al.</i> , 2012)
Stérols	$\beta$ -Sitostérol	(Zhi <i>et al.</i> , 2012; Hooper & Chandler, 1984)
	Sitostérone	
Polysaccharides	Sucrose	(Zhi <i>et al.</i> , 2012; Adamczak <i>et al.</i> , 2012; Commission E, 1990; Kim <i>et al.</i> , 2006)
	$\beta$ -Glucose	
	Quercétine 3 –O- $\beta$ -L-arabinopyranoside	
	Quercétine 3 –O- $\beta$ -D-glucopyranoside	
Alcaloïdes pirrolizidine	Tussilagine	(Capasso <i>et al.</i> , 2000; Chanaj-kaczmarek <i>et al.</i> , 2013)
	Isotussilagine	
	Senkirkine	
	Sénécionine	
Flavonoïdes	Kaempférol	(YuFeng; & XiuWei, 2009; Kim <i>et al.</i> , 2006; Chanaj-kaczmarek <i>et al.</i> , 2013)
Acides gras	Non disponible; identification via des pics RMN	(Chanaj-kaczmarek <i>et al.</i> , 2013; Zhi <i>et al.</i> , 2012)
Acides organiques	Acide chlorogénique	(Zhi <i>et al.</i> , 2012)
	Acide 3,5-dicaféoylquinique	
Acides aminés aliphatiques	Isoleucine	(Zhi <i>et al.</i> , 2012)
	Valine	
	Leucine	
Chromones	6-Acétyle-7-hydroxy-2,3-diméthylchromone	(Wu <i>et al.</i> , 2008)
	6-Carboxyl-7-hydroxy-2,3-diméthylchromone	
	6-Acétyle-2,2-diméthyl-4-chromanone	

#### 2.4.1.3.1 Composition chimique de l'huile essentielle de *T. farfara*

Au meilleur de notre connaissance, les deux seules études qui portent sur l'huile essentielle de *T. farfara* ont été réalisées sur des plantes issues de Chine et d'Europe (Yu-feng *et al.*, 2006; Dobravalskyte, 2013). L'huile essentielle de souche Asiatique est constituée en majorité de  $\beta$ -bisabolène (13,93 %), (*E*)-cyclo-undécène (8,49 %), 1-undécène (4,83%), 1-pentadécène (4,57 %).

En Europe, l'étude de l'huile essentielle de tussilage a été réalisée sur des fleurs d'origine française et lituanienne (Dobravalskyte, 2013). Les composés majoritaires identifiés dans l'huile essentielle issue de France sont le 1-nonène (34,1 %), le *n*-undecane (4,8 %) et le  $\alpha$ -pinène (4,2 %) alors qu'en Lituanie ce sont principalement le *n*-tricosane (21,7 %), le 1-nonène (8,1 %), le *n*-undecane (7,8 %) et le *n*-hexacosane (5,1 %).

Il n'est pas rare de trouver, en proportion minoritaire, des composés aliphatiques dans les huiles essentielles. Il est toutefois moins commun de retrouver ce type de composés en forte proportion. Un exemple bien connu est l'huile extraite des rhizomes d'iris. En effet, des composés tels que le myristate, l'oléate de méthyle, le laurate de méthyle, le pélargonate de méthyle, le caprylate de méthyle et le linoléate de méthyle s'y retrouvent (Naves, 1949). L'huile essentielle de rose, selon une étude de Bayrak & Akgül (1994), en contient également beaucoup, soit du nonadécane (18,3 %), du 1-nonadécane (5,1 %), du tricosane (1,3 %), du hénéicosane (8,9 %) et du heptadécane (2,4 %).

Tableau 2. Composition chimique d'huiles essentielles de *T. farfara* issues de populations européennes

Composés	Concentration (%)	
	Lituanie	France
1-Nonène	8,1	34,1
$\alpha$ -Pinène	3,7	4,2
Camphène	-	trace
1-Decène	-	2,1
$\alpha$ -Phellandrène	0,8	1,4
$p$ -Cymène	0,1	0,8
$n$ -Undecane	7,8	4,8
1-Dodecène	0,2	0,5
1-Decanol	0,1	-
1-Tridecène	0,1	0,3
$\alpha$ -Copaène	0,2	trace
$\beta$ -Cubebène	0,2	0,3
1-Tetradecène	0,9	-
$\beta$ -Caryophyllène	1,9	0,3
$\gamma$ -Elemène	0,2	0,4
$\alpha$ -Humulène	0,4	0,2
Germacrène D	0,7	0,6
$\beta$ -Selinène	0,7	0,6
$n$ -Pentadecane	0,5	-
$\beta$ -Bisabolène	1,2	0,7
$\delta$ -Cadinène	0,4	0,2
Spathulenol	2,1	0,7
Oxyde de caryophyllène	1,3	0,2
Tetradecanol	-	0,2
$n$ -Nonadecane	0,4	-
Phytol	1,4	0,4
$n$ -Tricosane	21,7	-
$n$ -Tetracosane	0,7	-
$n$ -Pentacosane	1,3	-
$n$ -Hexacosane	5,1	-
Total	62,2	53,0

### 2.4.2 Tanaisie vulgaire (*Tanacetum vulgare*)



Figure 5. *Tanacetum vulgare* (W. Freckmann, n.d.)

#### 2.4.2.1 Description physique

La tanaisie vulgaire est une plante vivace de la famille de *Asteraceae* dont l'odeur est habituellement très prononcée et variable en fonction du chémotype (Marie-Victorin, 1995). La tige est robuste et ramifiée vers le haut. Les feuilles, quant à elles, sont très divisées et quelques fois frisées. Les fleurs, en forme de boutons, sont toutes identiques : jaunes et regroupées en corymbes. Elles éclosent pendant la saison estivale.



#### 2.4.2.2 Distribution géographique

La tanaïsie est répartie dans tout le Québec et elle pousse en grande colonie le long des chemins et des habitations (Marie-Victorin, 1995). Elle est présente en Europe, en Asie, en Afrique, en Amérique du Nord et en Amérique du Sud (Mitich, 1992).

#### 2.4.2.3 Activités biologiques

Plusieurs extraits et composés isolés de la tanaïsie vulgaire sont intéressants d'un point de vue pharmacologique. En effet, cette plante possède des propriétés anti-inflammatoires (Schinella *et al.*, 1998; Singer *et al.*, 2008; Williams *et al.*, 1999), antioxydante (Bandoniene *et al.*, 2000; Juan-Badaturuge *et al.*, 2009; Wojdylo *et al.*, 2007), antibactérienne (El-Shazly *et al.*, 2002; Izzo *et al.*, 1995), vasodilatatrice (Lahlou *et al.*, 2008) et diurétique (Lahlou *et al.*, 2007). Par contre, peu de chercheurs se sont intéressés à l'activité biologique de l'huile essentielle. Les quelques publications retrouvées jusqu'à maintenant font état de l'activité insecticide, insectifuge et stimulant de la croissance de celle-ci (Gabel *et al.*, 1992; Larocque *et al.*, 1999; Palsson *et al.*, 2008).

##### 2.4.2.3.1 Utilisation ancestrale de la plante

Les Amérindiens ont utilisé cette plante comme insecticide, insectifuge, vermifuge, stimulant et emménagogue (Duke, 1985; Marie-Victorin *et al.*, 2002). De

plus, l'infusion des racines était utilisée pour traiter la toux et la tuberculose (Arnason, 1981; Moerman, 1998). Au Brésil, les feuilles, les fleurs et les tiges ont été utilisées comme anti-inflammatoire et comme antihypertenseur ainsi que contre certains vers parasites (Holetz *et al.*, 2002; Lahlou *et al.*, 2008). Au Maroc, elle était utilisée en tant que vermifuge, carminatif, antispasmodique, stimulant pour les viscères abdominaux, tonique, emménagogue, antidiabétique, diurétique et antihypertenseur (Lahlou *et al.*, 2008). Lors des nombreuses études scientifiques réalisées sur la tanaïsie vulgaire, quelques activités ancestrales de la plante ont été validées scientifiquement, telle que l'activité anti-inflammatoire et diurétique (Bandoniene *et al.*, 2000; Lahlou *et al.*, 2007).

#### 2.4.2.3.2 Activité anti-inflammatoire

L'extraction à l'acétone des parties aériennes séchées de la plante a montré une activité anti-inflammatoire moyenne (Bandoniene *et al.*, 2000).

#### 2.4.2.3.3 Activité antioxydante et antiradicalaire

Un extrait, riche en composés phénoliques, issu des feuilles de tanaïsie s'est montré antioxydant et antiradicalaire selon trois méthodes testées : réduction ferrique / dosage de pouvoir antioxydant (FRAP) ( $455 \pm 6$ ), évaluation de la capacité antiradicalaire sur le radical diphényl-picrylhydrazyle (DPPH $\cdot$ ) ( $469 \pm 9$ ) et le radical acide 2,2'-azino-bis(3-éthylbenzthiazoline-6-sulphonique (ABTS $^{+}$ ) ( $37 \pm 2$ ) (Wojdylo

*et al.*, 2007). Les résultats sont tous exprimés en  $\mu\text{M}$  de trolox par 100g de poids sec. Deux ans plus tard, Juan-Badaturuge *et al.* (2009) ont obtenu un extrait méthanolique antiradicalaire lors d'analyses sur le radical DPPH $\cdot$  ( $\text{CE}_{50} = 37 \pm 1 \mu\text{g/ml}$ ). De plus, grâce au fractionnement bioguidé, ils ont isolés trois composés antioxydants : 3,5-O-dicaféoylquinique acide, axillarine et la lutéoline.

#### 2.4.2.3.4 Potentiel antibactérien et antifongique

Le caractère antibactérien des extraits éthanoliques de tussilage a été démontré par deux études. L'inhibition de la croissance de *S. aureus* et de *Salmonella typhi* a été observée par le groupe de Izzo *et al.* (1995). Lors d'une autre expérience, une légère activité antibactérienne contre *S. aureus* ( $\text{MIC}_{80} = 500 \mu\text{g/ml}$ ) et *E. coli* ( $\text{MIC}_{80} = 500 \mu\text{g/ml}$ ) a été observé (Holetz *et al.*, 2002).

En plus de mettre en évidence l'activité antibactérienne de la plante, le groupe de Holetz *et al.* (2002) ont fait ressortir, lors de leur étude, que l'extrait éthanolique était antibactérien contre *Pseudomonas aeruginosa* ( $\text{MIC}_{80} = 500 \mu\text{g/ml}$ ) et antifongique sur *Candida krusei* ( $\text{MIC}_{80} = 500 \mu\text{g/ml}$ ) et *Candida tropicalis* ( $\text{MIC}_{80} = 500 \mu\text{g/ml}$ ).

#### 2.4.2.3.5 Toxicité

Lahlou *et al.* (2008) se sont intéressés à la toxicité des extraits aqueux obtenus à partir de cette plante et ont montrés que par ingestion oral aucune toxicité n'est observée chez la souris.

#### 2.4.2.3.6 Vasodilatateur

L'extrait aqueux des parties aériennes séchées de *T. vulgare* est vasodilatateur pour les souris (Lahlou *et al.*, 2008).

#### 2.4.2.3.7 Diurétique

L'extrait aqueux des parties aériennes séchées de *T. vulgare* a un effet sur l'augmentation de la diurèse, de la natriurèse et sur l'excrétion du potassium dans les urines de rongeurs (Lahlou *et al.*, 2007).

#### 2.4.2.3.8 Insecticide et insectifuge

L'action répulsive de la tanaïsie contre certains insectes (tique, acarien, *Leptinotarsa decemlineata*) a permis de prouver que son utilisation ancestrale était fondée (De Pooter *et al.*, 1989; Schearer, 1984; Pålsson *et al.*, 2008; Chiasson *et al.*, 2001).

#### 2.4.2.3.8 Effet attracteur de la plante envers les insectes

Les femelles de la teigne de la vigne (*Lobesia botrana*), un ravageur important des raisins en Europe, sont attirées par la tanaïsie, qui est une mauvaise herbe commune (Gabel *et al.*, 1992). Neuf composés isolés de l'huile essentielle (p-cymène, le D-limonène,  $\alpha$ -thujène,  $\alpha$ -thuyone,  $\beta$ -thuyone, alcool thujyle, terpinène-4-ol, (Z)-verbénol et pipéritone) ont été ciblés comme étant les composés responsables.

#### 2.4.2.3.9 Stimulation de la croissance

L'huile essentielle ajoutée à la diète de la tordeuse à bandes obliques (*Choristoneura rosaceana*) à des concentrations de 0,01% et 0,1% a eu un effet positif sur le développement de celle-ci (Larocque *et al.*, 1999).

Tel qu'exposé au tableau 3, plusieurs composés isolés de cette plante ont montré des activités biologiques intéressantes. Certaines d'entre elles permettent de rationaliser l'utilisation ancestrale de la plante.

Tableau 3. Exemple de composés isolés de *T. vulgare* présentant des activités biologiques

Famille du composé	Nom du composé	Activité biologique	Référence
Acide phénolique	Acide 3,5- <i>O</i> -dicafféoylquinique	Antioxydante	(Juan-Badaturuge <i>et al.</i> , 2009)
Flavonoïdes	Lutéoline		
	Axillarine		
	Méthyl ester de scutellarein	Anti-inflammatoire	(Williams <i>et al.</i> , 1999)
	6-hydroxylutéolin		
	6-hydroxylutéolin 7-glucoside		
	Apigénine		
	Lutéolin 7-glucuronides		
	Méthoxy flavones jaceosidine		(Schinella <i>et al.</i> , 1998)
	Eupatorine		
	Chrysoériol		
	Diosmétine		
Sesquiterpènes	Parthénolide	Antivirale contre l'herpès	(Alvarez <i>et al.</i> , 2011)
		Inhibe la dégranulation des mastocytes en empêchant une augmentation des niveaux de calcium intracellulaire.	(Hong <i>et al.</i> , 2011)
		Prévient la formation d'ulcère	(Tournier <i>et al.</i> , 1999)
		Cytotoxique contre carcinome pulmonaire humain fibroblaste des poumons de hamster chinois	(Rosselli <i>et al.</i> , 2012)
	Douglanine		
	Ludovicin A		
	Ludovicin B		
	1 $\alpha$ -Hydroxy-1-déoxoarglanine		
	11,13-Déhydrosantonine		

#### 2.4.2.4 Composition chimique

L'analyse phytochimique de plusieurs populations de *T. vulgare* a montré une multitude de variabilités intra-spécifiques dans des extraits (Rosselli *et al.*, 2012; Wolf *et al.*, 2012). En plus des composés présentés dans le tableau 3, qui traite de l'activité biologique, plusieurs autres composés ont été identifiés dans la plante et sont présentés dans le tableau 4.

Tableau 4. Exemple de composés présents dans différents extraits de *T. vulgare*

Famille de composé	Nom du composé	Référence
Acide gras	Acide stéarique	(Chandra <i>et al.</i> , 1987b)
Stérols	Sitostérol	(Chandra <i>et al.</i> , 1987b)
	Stigmastérol	
	$\beta$ -Sitostérol glucoside	
	Campestérol	(Hooper & Chandler, 1984) (Wilkomirski & Kucharska, 1992)
	Stigmastérol	
	$\beta$ -Sitosterol	
Triterpènes	$\beta$ -Amyrin	(Hooper & Chandler, 1984) (Wilkomirski & Kucharska, 1992)
	$\alpha$ -Amyrin	
	Pseudotaraxasterol	
	Taraxasterol	
Terpènes de type tétrahydrofurane	<i>trans</i> – $\Delta^{3,4}$ - Hydroperoxide de davanone	(Appendino <i>et al.</i> , 1984)
	<i>cis</i> – $\Delta^{3,4}$ - Hydroperoxide de davanone	
Sesquiterpènes	Tanacetol A	(Appendino <i>et al.</i> , 1984)
	Tanacetol B	
	<i>cis</i> -Longipinane-2,7-dione	(Ognyanov <i>et al.</i> , 1983)
	Crispolide	(Appendino <i>et al.</i> , 1982)
	8-Oxo-2 $\alpha$ -9-dihydroxy- <i>trans,trans</i> -germacra-1(10),4-dien- <i>trans</i> -6,12-olide	(Chandra <i>et al.</i> , 1987a)
	Tanavulgarol	(Chandra, Misra, & Thakur, 1987b)

Famille de composé	Nom du composé	Référence
Cétone sesquiterpénique	8 $\alpha$ ,9 $\beta$ -Dihydroxy-trans-germacra- 1(10),4-dien-trans-6,12-olide	(Chandra et al., 1987a)
Flavonoides	Acacétine	(Kurkina, Khusainova, Daeva, & Kadentsev, 2011)
	Lutéoline	
	Cinaroside	
	Eupatiline	
	Jaceidine	
	Jaceoside	
	Apigénine	(Kurkina <i>et al.</i> , 2011) (Williams, Harborne, & Eagles, 1999) (Kurkina et al., 2011) (Chandra <i>et al.</i> , 1987b)
	Apigenine-triméthyl éther	(Chandra <i>et al.</i> , 1987b)
	6-Hydroxykaempferol 3,6,4'-trimethyl ether	(Williams, Harborne, Geiger, <i>et al.</i> , 1999)
	Quercetagetin 3,6,3'-trimethyl ether	
	Scutellarein- Methyl ethers	
	Luteolin-7-glucuronides	
	6-Hydroxyluteolin	
	6-Hydroxyluteolin 7-glucoside	
	6-Hydroxyflavones	
	6-Hydroxyflavonols	
	Tilianine	(Kurkina <i>et al.</i> , 2011)
	Acacétine	
	Cosmosiin	
Polysaccharide	Polysaccharide complexe	(Polle, Ovodova, Shashkov, & Ovodov, 2002)
Sucres	n-Butyl- $\alpha$ -gluco-pyranoside	(Chandra <i>et al.</i> , 1987b)
	n-Décyl-glucoside	



#### 2.4.2.5.1 Composition de l'huile essentielle

Au cours des nombreuses recherches effectuées, l'huile essentielle de tanaïsie vulgaire a présenté une grande diversité de chémotypes (Héthelyi *et al.*, 1981; Tétényl *et al.*, 1975; Héthelyi *et al.*, 1981; Rohloff *et al.*, 2004; Wolf *et al.*, 2012). Certains semblent spécifiques à certaines régions, alors que d'autres sont présents dans la plupart des pays. Tel que décrit dans la section 2.2.5, plusieurs facteurs tels que le stade de croissance et le pourcentage d'humidité de la plante, les parties utilisées pour l'extraction et la méthode d'extraction ont été identifiés comme source d'influence possible de la variation dans la composition chimique de l'huile essentielle de la tanaïsie (Chiasson *et al.*, 2001).

Le groupe de Keskitalo *et al.* (2001) ont observé des liens entre la composition chimique et la morphologie de la plante poussant en Finlande. En effet, les plantes contenant le chémotype camphor possèdent les plus grandes pousses et fleurissent un peu plus tardivement. Celles correspondant aux chémotypes davadone et artemisia cétone produisent le plus grand nombre de capitules, possèdent les plus grands corymbes et sont les dernières à fleurir.

Tableau 5. Les divers chémotypes de *Tanacetum vulgare* identifiés dans la littérature scientifique

Composés majoritaires des chémotypes d'huiles essentielles	Provenance des huiles essentiels analysées									
	Canada	Italie	Terre de feu	Hongrie	Finlande	Pays-Bas	Belgique	Norvège	Lituanie	Suède
Artemisia cétone		X		x	x	x			x	
Bornéol				x						
Acétate de bornyle		X			x					
Camphor	X			x	x			x	x	
Chrysanthénone	X							x		
Acétate de chrysantényle		X		x	x	x	x			
1,8-Cinéole				x	x			x	x	
α-Cubébène	X									
Davanone				x	x					
Dihydrocarvone	X			x						
Germacrène-D					x					
Acétate d'isobornyle					x					
Myrténol		x								
α-Pinène					x					x
Pinocamphone					x					
Pipéritone	X			x						
Sabinène					x					
Terpinèn-4-ol	X									
Acétate de β-terpinyle				x						
Acétate de 4-thujèn-2α-yle				x						
β-Thujone	X	x	x	x	x	x	x	x	x	
α-Thujone	X							x	x	
γ-Terpinène				x						
Umbellulone				x	x					
Artemisia cétone + Acétate de chrysantényle						x				
Artemisia cétone + Camphor						x				
Artemisia cétone + Artemisia alcool								x		
Artemisia cétone + Camphor + Dihydrocarvone						x				
Artemisia cétone + Artemisia alcool + Myrténol				x						
Artemisia cétone + Umbellulone				x						
Bornéol + Acétate de bornyle				x						
Acétate de bornyle + Camphor + Germacrène-D + Thujone					x					

Composés majoritaires des chémotypes d'huiles essentielles	Provenance des huiles essentiellees analysées									
	Canada	Italie	Terre de feu	Hongrie	Finlande	Pays-Bas	Belgique	Norvège	Lituanie	Suède
Camphor + Bornéol				x						
Camphor + $\beta$ -Thujone					x		x			
Camphor + 1,8-Cinéole						x				
Camphor + 1,8-Cinéole+Bornéol	X									
1,8-Cinéole + Terpinène-4-ol				x						
Chrysanthénol + Acétate de chrysantényle				x				x		
Germacrène-D + Sabinène					x					
Germacrène-D + Camphor					x					
Germacrène-D + Acétate de bornyle + Camphor					x					
Lyratol + Lyratyl acétate				x		x				
Lyratol + Camphor						x				
Pinène + Camphène				x						
Sabinène + Camphor + Thujone					x					
Sabinène + Germacrène-D + Camphor + Thujone					x					
Sabinène + Germacrène-D + $\alpha$ -Pinène + Thujone					x					
$\beta$ -Thujone + 1,8-Cinéole + Sabinène					x					
$\beta$ -Thujone + Germacrène				x	x					
$\beta$ -Thujone + Germacrène + $\alpha$ -Pinène				x	x					
Thujone + Sabinène + Umbellulone					x					
Thujone + Acétate de bornyle + Sabinène					x					
Thujone + Umbellulone + Germacrène-D					x					
Tricyclène + Myrcène					x					
Umbellulone + Sabinène + Thujone					x					
Umbellulone + Germacrène-D + sabinène + Thujone					x					
Umbellulone + Thujone					x					
Umbellulone + Thymol				x						
Référence	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10

1 : (Collin *et al.*, 1993; Tétényl *et al.*, 1975; Chiasson *et al.*, 2001)

2 : (Nano *et al.*, 1979; Collin *et al.*, 1993)

3 : (Gallino, 1988)

4 : (Héthelyi *et al.*, 1981; Tétényl *et al.*, 1975)

5 : (Collin *et al.*, 1993; Keskitalo *et al.*, 2001; Tétényl *et al.*, 1975)

6 : (Hendricks *et al.*, 1990; Hendricks *et al.*, 1990)

7 : (De Pooter *et al.*, 1989)

8 : (Rohloff *et al.*, 2004; Rohloff *et al.*, 2004)

9 : (Mockute & Judzentiene, 2004)

10 : (Pålsson *et al.*, 2008)

## CHAPITRE 3

### ARTICLE SCIENTIFIQUE 1

CARACTÉRISATION CHIMIQUE ET ÉVALUATION DE L'ACTIVITÉ  
ANTIBACTÉRIENNE DE L'HUILE ESSENTIELLE DE *TUSSILAGO FARFARA L.*

## Résumé

La composition chimique et l'activité antibactérienne de l'huile essentielle de *T. farfara* L. a été étudiée. Les résultats montrent que l'huile essentielle est active contre *E. coli* (CMI<sub>90</sub> = 1511 ± 85 µg) et *S. aureus* (CMI<sub>90</sub> = 170 ± 11 µg). La composition chimique a été analysée par GC-FID et 45 différentes molécules ont été identifiées correspondant à ≥ 85% du profil chromatographique. Les composés majoritaires sont le 1-nonène (40,1 %), le α-phellandrène (26,0 %), le p-cymène (6,6 %), le 1,10-undecadiène (4,1 %), l'acide dodécanoïque (2,4 %), et le 1-décène (1,1 %). L'activité antibactérienne des principaux composés identifiés a été testée contre *E. coli* et *S. aureus*. L'acide dodécanoïque (6.6 ± 0.4 µg), le 1-décène (11 ± 1 µg), le α-phellandrène (12 ± 1 µg), le β-caryophyllène (24 ± 1 µg), le (E)-cyclodécène (25.8 ± 0.9 µg), le p-cymène (26.3 ± 3.1 µg), le tricosane (31 ± 2 µg) et le tétracosane (35 ± 4 µg) explique l'activité de l'huile contre *E. coli*. L'activité antibactérienne de l'huile essentielle de *T. farfara* contre *S. aureus* est expliqué par le p-cymène et l'acide dodécanoïque respectivement avec une CMI<sub>90</sub> de 5.6 ± 0.2 µg et 6.0 ± 0.2 µg.

**Chemical characterisation and antibacterial activity of *Tussilago farfara* (L.)  
essential oils from Quebec**

Marie-Anne Boucher, Héloïse Côté, André Pichette and Jean Legault \*

Laboratoire d'Analyse et de Séparation des Essences Végétales, Université du Québec à Chicoutimi. 555 boulevard de l'Université, Chicoutimi, QC G7G 4B7, Canada.

**Keywords:** *Tussilago farfara*, essential oil, antibacterial activity, volatile compounds, terpenes, sesquiterpenes, aliphatic compounds

\*Corresponding author. Tel.: +1 418 545 5011 ext 2334. Fax: +1 418 545 5012.

E-mail adress: Jean.Legault@uqac.ca

## Abstract

The chemical composition and the antibacterial activity of *T. farfara* L. essential oils was investigated. The results showed that essential oil is active against *E. coli* ( $\text{MIC}_{90} = 1511 \pm 85 \mu\text{g}$ ) and *S. aureus* ( $\text{MIC}_{90} = 170 \pm 11 \mu\text{g}$ ). The chemical composition was analyzed by GC-FID and 45 different compounds were identified corresponding to  $\geq 85\%$  of the GC profile. The main components were 1-nonene (40.1%),  $\alpha$ -phellandrene (26.0%), p-cymene (6.6%), 1,10-undecadiene (4.1%), dodecanoic acid (2.4%), and 1-decene (1.1%). The antibacterial activity of the main compounds was tested against *E. coli* and *S. aureus*. Dodecanoic acid ( $6.6 \pm 0.4 \mu\text{g}$ ), 1-decene ( $11 \pm 1 \mu\text{g}$ ),  $\alpha$ -phellandrene ( $12 \pm 1 \mu\text{g}$ ),  $\beta$ -caryophyllene ( $24 \pm 1 \mu\text{g}$ ), (E)-cyclodecene ( $25.8 \pm 0.9 \mu\text{g}$ ), p-cymene ( $26.3 \pm 3.1 \mu\text{g}$ ), tricosane ( $31 \pm 2 \mu\text{g}$ ) and tetracosane ( $35 \pm 4 \mu\text{g}$ ) explain the oil activity against *E. coli*. Antibacterial activity of the essential oil of *T. farfara* against *S. aureus* was explained by p-cymene and dodecanoic acid, respectively with a  $\text{MIC}_{90}$  of  $5.6 \pm 0.2 \mu\text{g}$  and  $6.0 \pm 0.2 \mu\text{g}$ .

## 1. Introduction

*Tussilago farfara* L. was a useful vernal plant introduced in Quebec from Europe during the 18<sup>th</sup> century [1]. In America, the roots of this plant were used traditionally by Iroquois, Micmac and Malecite Amerindian [2,3] to treat cough and tuberculosis, and leaves were smoked as a domestic remedy for asthma [1]. In China, the flowers buds of this plant have been traditionally used to treat cough, asthma, and bronchitis [4]. Some studies reported that isolated compounds from this plant have many biological activities, including antidiabetic [5,6], anti-inflammatory [7–10], antioxidant [11], neuroprotective [12] and cardiovascular-respiratory properties [4]. However no results related to the biological activity of *T. farfara* essential oil have been published.

Regarding the chemical composition, several compounds are already reported in *T. Farfara*, such as sesquiterpenoids [13,14], triterpenoids [3], phenolic compounds [5], phenol acids [15], sterols [3], pyrrolizidine alkaloids [16], flavonoids [11,17], water-soluble polysaccharides [15], and several others [17]. However, only two studies have analysed essential oil and absolute, and their analysis covers Chinese and European varieties only; *T. farfara* flower oils from Asia were principally composed of  $\beta$ -bisabolene, (E)-cycloundecene, 1-undecene, 1-pentadecene, epi-bicyclosesquiphellandrene [18], and European concrete shows tricosane, pentacosane, hexacosane.  $\alpha$ -penchocamphorone, and dodecane as its major components [19].



In this study, we reported GC analysis of essential oil of *T. farfara* from Saguenay, Canada. Its antibacterial activity was investigated against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* and compared with the activity of *Thymus vulgaris* essential oil. We also tested the antibacterial activity of some major compounds, including 1-nonene, 1-decene,  $\alpha$ -humulene,  $\alpha$ -phellandrene,  $\beta$ -caryophyllene, p-cymene, (E)-cyclodecene, dodecanoic acid, tetracosane, and tricosane to find those responsible for the activity.

## **2. Materials and methods**

### *2.1. Chemicals*

Standard compounds used for GC analyses or biological tests were supplied by Sigma-Aldrich (1-nonene, p-cymene,  $\alpha$ -phellandrene, (E)-cyclodecene, tetracosane), Fluka ( $\alpha$ -humulene), Takasago ( $\beta$ -caryophyllene), and Acros Organics (1-decene, dodecanoic acid, tricosane).

### *2.2 Essential oils*

The flowers of *T. farfara* were collected in May 2014, in the City of Saguenay. Voucher specimen No QFA0610841 has been filed at the Louis-Marie herbarium of Laval University, Quebec, Canada. Essential oil was obtained from freshly harvested flowers by hydrodistillation over a 3-hour (0.08 % (w/w) yield; refractive index =

1.4534; density = 845.94 mg/ml). Essential oil of *T. vulgaris* was purchased from Aliksir Inc (thymol chemotype).

### 2.3 GC/MS Analysis of the essential oil

Samples were injected on an Agilent 6890N GC equipped with a non-polar DB-5 column and a polar SolgelWax column (30 m x 0.25 mm x 0.25 mm), as well as two FID detectors. The oils were injected undiluted (0.1 µL injection volume, split 1:235) and undried. The temperature program was 40 °C for 2 minutes, 2 °C/minute up to 210 °C, and 210 °C for 13 minutes. Samples were also injected on an Agilent 7890A GC coupled to an Agilent 5975C InertXL EI/CI mass spectrometer, equipped with a DB-5MS column using the same temperature program and a split of 1:1000. Compounds were identified from their retention indexes as calculated from even-numbered C8 to C36 alkane standards and/or from MS databases (NIST08, HPCH 2205 and custom libraries built from pure compounds). Quantification comes from the FID detector response on the DB-5 column without any correction factor. All standards are co-injected to valid the identification.

### 2.4 Evaluation of antibacterial activity

#### 2.4.1 Bacterial strains

The *in vitro* antimicrobial activity of *T. farfara* essential oil was tested against gram-negative *E. coli* (ATCC 25922) and gram-positive *S. aureus* (ATCC 25923).

#### 2.4.2. Culture methods

Test organisms were stored at -80°C. All micro-organisms were first left 16–18 hours at 37°C in Nutrient Broth base (Difco). Cellular density of inoculum was obtained by optical densities measured at 600 nm for *E. coli* and 660 nm for *S. aureus* using a Multiscan go UV/Vis microplate spectrophotometer (Labsystems). Inoculum was re-diluted in NB to obtain the required bacterial concentration.

#### 2.4.3 Antibacterial activity

Antibacterial activity of *T. farfara* essential oil was evaluated using the test for hydrophobic compounds (ATHC) described by Côté *et al.* (*in review*). *T. vulgaris* essential oil (thymol chemotype) was used as positive control [21]. Reduction of resazurin was detected with a Fluoroskan Ascent FI™ plate reader (Labsystems).

### 3. Results and Discussion

To the best of our knowledge, no study reports the antibacterial activity of *T. farfara* essential oil. However, there is one study about qualitative screening of the antibacterial activity of *T. farfara* ether extract [22]. In the study from Izzo *et al.* (1995), *T. farfara* capitula from Italia was active against *Bacillus subtilis* and *E. coli*, but it was inactive against *S. aureus*. In the present study, essential oil has showed

low activity against *E. coli* ( $\text{MIC}_{90} = 1511 \pm 85 \mu\text{g}$ ) and good activity against *S. aureus* ( $\text{MIC}_{90} = 170 \pm 11 \mu\text{g}$ ) (table 1).

In order to identify the compounds mainly responsible for this antibacterial activity, the chemical composition of *T. farfara* was analysed by GC. This study shows that *T. farfara* essential oil from North America was composed of: aliphatic compounds (47%), monoterpenes (32%), sesquiterpenes (4%), and fatty acid (4%). The main compounds were 1-nonene (40.1%), (2.4%), and 1-decene (1.1%). Altogether, 45 compounds were identified; all of them were already described in the scientific literature [23].

North America *T. farfara* essential oil was strongly different from the essential oils from Asia and Europe [18,19]. Essential oil from Asia was mainly composed of  $\beta$ -bisabolene (13.9%), (E)-cyclo-undecene (8.5%), 1-undecene (4.8%), 1-pentadecene (4.6%) and epi-bicyclosesquiphellandrene (3.9%) [18]. In France their main compounds were 1-nonene (34.1%), n-undecane (4.8%) and  $\alpha$ -pinene (4.2%) while in Lithuania main compounds were n-tricosane (21.7%), 1-nonene (8.1%), n-undecane (7.8%), n-hexacosane (5.1%) [19]. Only few essential oils are mainly composed of aliphatic compound and, surprisingly, that is the case of the essential oil of *T. farfara*. Likewise, studies from Naves (1949) and Bayrak and Akgül (1994) reported essential oils mainly composed of aliphatic extracted respectively from *Iris ssp.* Rhizomes, and *Rosa ssp.* flowers.

To identify the compounds responsible for the antibacterial activity, major compounds including 1-nonene (40.1%),  $\alpha$ -phellandrene (26.0%), p-cymene (6.6%), dodecanoic acid (2.4%), 1-decene (1.1%), (E)-cyclodecene (1.0%),  $\beta$ -caryophyllene (0.7%), tricosane (0.3%), tetracosane (0.3%), and  $\alpha$ -humulene (0.2%) were tested against *E. coli* and *S. aureus*. As shown in table 1, 1-decene,  $\alpha$ -phellandrene,  $\beta$ -caryophyllene, p-cymene, (E)-cyclodecene, dodecanoic acid, tetracosane, and tricosane explain the activity of oil against *E. coli*. Dodecanoic acid, 1-decene and  $\alpha$ -phellandrene are the most active, respectively with a MIC<sub>90</sub> of  $6.6 \pm 0.4 \mu\text{g}$ ,  $11 \pm 1 \mu\text{g}$  and  $12 \pm 1 \mu\text{g}$  in comparison with  $\beta$ -caryophyllene ( $24 \pm 1 \mu\text{g}$ ), (E)-cyclodecene ( $25.8 \pm 0.9 \mu\text{g}$ ), p-cymene ( $26 \pm 3 \mu\text{g}$ ), tricosane ( $31 \pm 2 \mu\text{g}$ ) and tetracosane ( $35 \pm 4 \mu\text{g}$ ). Antibacterial activity of *T. farfara* essential oil against *S. aureus* was explained by p-cymene and dodecanoic acid, respectively with a MIC<sub>90</sub> of  $5.6 \pm 0.2 \mu\text{g}$  and  $6.0 \pm 0.2 \mu\text{g}$  (Table 1).

In the scientific literature, antimicrobial activity of essential oils is usually assigned to terpenoid and phenolic compounds [26,27]. In this study, antibacterial activity was explained by aliphatic compounds, by terpenes and a fatty acid (table 1). This is due to the new method used to test antibacterial activity which is specially design for non-polar products (Côté *et al.*, *in review*). To the best of our knowledge, all aliphatic compounds tested in our study were never found to be active. As an example, using disc diffusion method, the extract mainly contained hexacosane, tricosane and heneicosane, was inactive against *E. coli* and *S. aureus* [28]. Our results suggest

that aliphatic compounds are active against *E. coli*. Ouattara *et al.* (1997) showed the activity of dodecanoic acid against three gram positive bacteria (*Carnobacterium piscicola*, *Lactobacillus curvatus* and *Lactobacillus sake*), but it was never tested against *E. coli* and *S. aureus*. Our study confirms that it is active against some gram positive bacteria (*S. aureus*), and also that it is active against gram negative (*E. coli*). The monoterpene p-cymene had previously demonstrated no antibacterial activity whereas our study concludes moderate antibacterial activity [30,31]. Two sesquiterpenes,  $\alpha$ -humulene (MIC<sub>90</sub> = 2.6  $\mu$ g/ml) and  $\beta$ -caryophyllene (MIC<sub>90</sub> = 5.1  $\mu$ g/ml), showed an interesting activity against *S. aureus* in a previous study [32]. However, these two compounds showed no interesting antibacterial activity against this bacterium in our study.

In conclusion, this study reports for the first time the antibacterial activity of *T. farfara* essential oil against *E. coli* and *S. aureus*. The main components:  $\alpha$ -phellandrene (25.6%), p-cymene (6.6%), dodecanoic acid (2.4%), 1-decene (1.1%), (E)-cyclodecene (1.0%),  $\beta$ -caryophyllene (0.7%), tricosane (0.3%), and tetracosane (0.3%) are responsible for the antibacterial activity. Consider these interesting results, study of several *T. farfara* populations from Quebec could be considered.

## Acknowledgments

The authors are grateful to Catherine Dussault and Karl Girard-Lalancette for their help within biological assay, and Benoit Roger and Laboratoire Phytochemia for their advices about GC. This work was supported by funds from the *Fonds de recherche québécois sur la nature et les technologies*.

**Table 1.** Antimicrobial activity of *T. farfara* essential oil, and some of its main compounds against *E. coli* and *S. aureus*.

Tested product	MIC <sub>90</sub> (µg) <i>E. coli</i>	MIC <sub>90</sub> (µg) <i>S. aureus</i>
<i>Tussilago farfara</i> essential oil	1511 ± 85	170 ± 11
1-Nonene	> 40	> 40
1-Decene	11 ± 1	> 40
α-Humulene	> 40	> 40
α-Phellandrene	12 ± 1	> 40
β-Caryophyllene	24 ± 1	> 40
p-Cymene	26 ± 3	5.6 ± 0.2
(E)-Cyclodecene	25.8 ± 0.9	> 40
Dodecanoic acid	6.6 ± 0.4	6.0 ± 0.2
Tetracosane	35 ± 4	> 40
Tricosane	31 ± 2	> 40
<i>Thymus vulgaris</i> essential oil (positive control)	35 ± 4	22 ± 1

**Table 2.** Composition of *T. farfara* essential oil

Name	DB-5 column		SolgelWax column	
	I. R.	%	%	I. R.
1-Octene	787	0.2	0.2	821
1-Nonene	877	40.1	40.5	910
(E)-1,3-Nonadiene	912	0.2	0.2	910
$\alpha$ -Thujene	915	<0.1	<0.1	1010
$\alpha$ -Pinene	917	<0.1	<0.1	1006
Myrcene	987	1.0	0.8	1138
1-Decene	987	1.1	0.9	1026
$\alpha$ -Phellandrene	1001	26.0	25.4	1133
para-Cymene	1019	6.6	6.6	1243
Limonene	1023	0.1	0.1	1172
$\beta$ -Phellandrene	1023	0.1	0.1	1181
(E)- $\beta$ -Ocimene	1045	<0.1	<0.1	1233
$\gamma$ -Terpinene	1053	<0.1	<0.1	1220
1,10-Undecadiene	1094	4.1	4.2	1158
Unknown <sup>1</sup>	1098	3.1	3.1	1220
1-Undecene	1089	0.4	0.4	1121
(E)-Cyclodecene	1247	1.0	-	-
Unknown <sup>2</sup>	1278	0.8	-	-
Prégeijerène B	1282	0.6	-	-
Unknown <sup>3</sup>	1321	1.3	-	-
Unknown <sup>4</sup>	1331	0.4	-	-
7-epi-Silphiperfol-5-ene	1337	0.3	-	-
Silphiperfol-6-ene	1374	<0.1	-	-
$\alpha$ -Copaene	1373	<0.1	<0.1	1463
$\beta$ -Cubebene	1384	<0.1	<0.1	1509
Unknown <sup>5</sup>	1388	0.5	-	-
$\beta$ -Caryophyllene	1411	0.7	0.5	1556
$\alpha$ -Humulene	1446	0.2	0.2	1625
<i>trans</i> - $\beta$ -Farnesene	1456	<0.1	<0.1	1655
Germacrene D	1475	1.1	1.1	1667
$\beta$ -Selinene	1486	0.2	0.2	1673
( <i>Z,E</i> )- $\alpha$ -Farnesene	1494	<0.1	<0.1	1688
$\alpha$ -Muurolene	1496	<0.1	<0.1	1692
$\beta$ -Bisabolene	1506	0.1	0.1	1698
$\gamma$ -Cadinene	1509	<0.1	<0.1	1728
$\delta$ -Cadinene	1525	0.1	0.1	1718
Spathulenol	1572	0.3	0.3	2075



Name	DB-5 column		SolgelWax column	
	I. R.	%	%	I. R.
Dodecanoic acid	1572	2.4	2.7	2454
Lauric acid. ethyl ester	1594	0.3	0.3	1826
Humulene epoxyde II	1599	0.2	0.2	2012
$\tau$ -Muurolol	1635	<0.1	<0.1	2138
$\tau$ -Cadinol	1635	<0.1	<0.1	2122
$\alpha$ -Cadinol	1647	<0.1	<0.1	2183
Tetradecanoic acid	1767	0.4	0.4	2697
Ethyl myristate	1793	<0.1	<0.1	2031
Palmitic acid	1962	0.3	0.3	2882
Ethyl palmitate	1993	<0.1	<0.1	2236
Tricosane	2291	0.3	0.3	2178
Tetracosane	2316	0.3	-	-
Total		88.4	86.7	

<sup>4</sup>Non identified compound: MS fragmentation peaks 67, 79 (44), 108 (29), 55 (25), 81 (20), 93 (15), 77 (15) 135 (2) m/z

<sup>5</sup>Non identified compound: MS fragmentation peaks 67, 81 (80), 55 (71), 54 (62), 82 (57), 79 (54), 95 (46) 180 (1) m/z

<sup>6</sup>Non identified compound: MS fragmentation peaks 111, 126 (97), 71 (58), 109 (34), 95 (28), 93 (24), 55 (23) 175 (1) m/z

<sup>7</sup>Non identified compound: 97, 107 (44), 55 (29), 83 (22), 81 (22), 109 (20), 69 (18) 139 (12) m/z

<sup>8</sup>Non identified compound: 100, 71 (100), 111 (80), 109 (43), 69 (41), 55 (28), 95 (23) 155 (4) m/z

## References

- [1.] Marie-Victorin F. **(1995)** Flore Laurentienne. 3rd ed. Les presses de l'université de Montréal; p. 1081.
- [2.] Herrick JW. **(1977)** Iroquois Medical Botany. State University of New York; p. 473.
- [3.] Hooper SN, Chandler RF. **(1984)** Herbal remedies of the Maritime Indians: phytosterols and triterpenes of 67 plants. *Journal of Ethnopharmacology*, **10**, 181–194.
- [4.] Li Y, Wang Y-M. **(1988)** Evaluation of Tussilagone: a cardiovascular-respiratory stimulant isolated from Chinese herbal medicine. *General Pharmacology*, **19**, 261–263.
- [5.] Gao H, Huang Y-N, Gao B, Xu P-Y, Inagaki C, Kawabata J. **(2008)**  $\alpha$ -Glucosidase inhibitory effect by the flower buds of *Tussilago farfara* L. *Food Chemistry*, **106**, 1195–1201.
- [6.] Park HR, Yoo MY, Seo JH, Kim IS, Kim NY, Kang JY, Cui L, Lee C-S, Lee C-H, Lee HS. **(2008)** Sesquiterpenoids isolated from the flower buds of *Tussilago farfara* L. inhibit diacylglycerol acyltransferase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **56**, 10493–10497.
- [7.] Li W, Huang X, Yang X-W. **(2012)** New sesquiterpenoids from the dried flower buds of *Tussilago farfara* and their inhibition on NO production in LPS-induced RAW264.7 cells. *Fitoterapia*, **83**, 318–322.
- [8.] Hwangbo C, Lee HS, Park J, Choe J, Lee J-H. **(2009)** The anti-inflammatory effect of tussilagone, from *Tussilago farfara*, is mediated by the induction of heme oxygenase-1 in murine macrophages. *International Immunopharmacology*, **9**, 1578–1584.
- [9.] Ryu JH, Jeong YS, Sohn DH. **(1999)** A new bisabolene epoxide from *Tussilago farfara*, and inhibition of nitric oxide synthesis in LPS-activated macrophages. *Journal of Natural Products*, **62**, 1437–1438.
- [10.] Hwang S-B, Chang MN, Garcia ML, Han QQ, Huang L, King VF, Kaczorowski GJ, Winquist RJ. **(1987)** L-652,469 - a dual receptor antagonist of platelet activating factor and dihydropyridines from *Tussilago farfara* L. *European Journal of Pharmacology*, **141**, 269–281.

- [11]. Kim M-R, Lee JY, Lee H-H, Aryal DK, Kim YG, Kim SK, Woo E-R, Kang KW. **(2006)** Antioxidative effects of quercetin-glycosides isolated from the flower buds of *Tussilago farfara* L. *Food and Chemical Toxicology*, **44**, 1299–1307.
- [12]. Cho J, Kim HM, Ryu J-H, Jeong YS, Lee YS, Jin C. **(2005)** Neuroprotective and antioxidant effects of the ethyl acetate fraction prepared from *Tussilago farfara* L. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, **28**, 455–460.
- [13]. Liu L-L, Yang J-L, Shi Y-P. **(2011)** Sesquiterpenoids and other constituents from the flower buds of *Tussilago farfara*. *Journal of Asian Natural Products Research*, **13**, 920–929.
- [14]. Aoita Y, Kikuchi M. **(1998)** Triterpenoids from Flower Buds of *Tussilago farfara* L. *Nature Medecine*, **52**, 273–275. .
- [15]. Adamczak A, Buchwald W, Gryszczyńska A. **(2012)** Phytochemical variability of coltsfoot (*Tussilago farfara* L. ) in Poland. *Herba Polonica*; **58**, 7–14. .
- [16]. Capasso R, Izzo A A, Pinto L, Bifulco T, Vitobello C, Mascolo N. **(2000)** Phytotherapy and quality of herbal medicines. *Fitoterapia*, **71**, S58–S65.
- [17]. YuFeng; L, XiuWei Y. **(2009)** HPLC fingerprint of chemical constituents of Flos Farfarae. *Acta Pharmaceutica Sinica*, **44**, 510–514. .
- [18]. Yu-feng L, Xiu-wei Y, Bin W. **(2006)** GC-MS Analysis of Essential Oil Constituents from Buds of *Tussilago farfara* L. *Journal of Chinese Pharmaceutical Sciences*, **15**, 10–15.
- [19]. Dobraval'skyte D. **(2013)** Le bioraffinage de Myrrhis odorata, *Tussilago farfara* et *Calamintha grandiflora* pour la production d'arômes et d'antioxydants. Institut National Polytechnique de Toulouse.
- [20]. Coté H, Boucher M-A, Roger B, Pichette A, Legault J. **(In review)** Antibacterial potential of whole *Abies balsamea* oleoresin used in Amerindian traditional medicine. *Journal of Natural Product*.
- [21]. Rota MC, Herrera A, Martínez RM, Sotomayor J A., Jordán MJ. **(2008)** Antimicrobial activity and chemical composition of *Thymus vulgaris*, *Thymus zygis* and *Thymus hyemalis* essential oils. *Food Control*, **19**, 681–687.
- [22]. Izzo AA, Carlo G Di, Biscardi D, Fusco R De, Mascolo N, Borrelli F, Capasso F. **(1995)** Biological Screening of Italian Medicinal Plants for Antibacterial Activity. *Phytotherapy Research*, **9**, 281–286.

- [23]. Adams RP. **(2007)** Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry. 4th ed. Allured Publishing Corporation; 804.
- [24]. Naves Y-R. **(1949)** Etudes sur les matières végétales volatiles XCVII. Sur les esters méthyliques constituants de l'huile essentielle d'iris. *Helvetica Chimica Acta*, **32**, 2306–2309.
- [25]. Bayrak A, Akgül A. **(1994)** Volatile oil composition of Turkish rose (*Rosa damascena*). *Journal of Science Food Agriculture*, **64**, 441–448.
- [26]. Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M. **(2008)** Biological effects of essential oils - A review. *Food Chemistry and Toxicology*, **46**, 446–475.
- [27]. Helander IM, Alakomi H, Mattila-sandholm T. **(1998)** Characterization of the Action of Selected Essential Oil Components on Gram-Negative Bacteria. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **46**, 3590–3595.
- [28]. Kotan R, Cakir A, Dadasoglu F, Aydin T, Cakmakci R, Ozer H, Kordali S, Mete E, Dikbas N. **(2010)** Antibacterial activities of essential oils and extracts of *Turkish Achillea*, *Satureja* and *Thymus* species against plant pathogenic bacteria. *Journal of Science Food Agriculture*, **90**, 145–160.
- [29]. Ouattara B, Simard RE, Holley R A, Piette GJ, Bégin A. **(1997)** Antibacterial activity of selected fatty acids and essential oils against six meat spoilage organisms. *International Journal of Food Microbiology*, **37**, 155–162.
- [30]. Dorman HJ, Deans SG. **(2000)** Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology*, **88**, 308–316.
- [31]. Bagamboula C., Uyttendaele M, Debevere J. **(2004)** Inhibitory effect of thyme and basil essential oils, carvacrol, thymol, estragol, linalool and p-cymene towards *Shigella sonnei* and *S. flexneri*, *Food Microbiology*, **21**, 33–42.
- [32]. Pichette A, Larouche P-L, Lebrun M, Legault J. **(2006)** Composition and antibacterial activity of *Abies balsamea* essential oil. *Phytotherapy Research*, **20**, 371–373.

## CHAPITRE 4

### ARTICLE SCIENTIFIQUE 2

POTENTIEL ANTIBACTÉRIEN, ANTIOXYDANT, CYTOTOXIQUE ET ANTI-INFLAMMATOIRE DE DEUX CHEMOTYPES DE L'HUILE ESSENTIELLE DE  
*TANACETUM VULGARE L.*

## Résumé

Dans cet article, deux huiles essentielles de *Tanacetum vulgare* (EOA et EOB) issues de deux régions différentes du Québec, (Canada) ont été analysées by GC-FID. Les composés majoritaires identifiés dans EOA sont le camphre (30,1 %), le bornéol (10,7 %), le 1,8-cinéole (10,4%). EOB est, quant à elle, composée principalement de  $\beta$ -thujone (73,9 %). L'activité antibactérienne, cytotoxique, antioxydante et anti-inflammatoire de ces huiles et de leurs composés majoritaires ont été testées. Les deux huiles sont inactives contre *E. coli* ( $\text{CMI}_{90} > 300 \mu\text{g}$ ) alors que des activités antibactériennes contre *S. aureus* ont été identifiées avec une  $\text{CMI}_{90}$  de  $228 \pm 22 \mu\text{g}$  pour EOA et  $129 \pm 11 \mu\text{g}$  pour EOB. Pour les deux huiles, le camphre est en partie responsable de l'activité contre *S. aureus* ( $\text{CMI}_{90} = 26 \pm 3 \mu\text{g}$ ). D'autre part, les deux huiles essentielles ont montré une activité anti-inflammatoire en inhibant la production d'oxyde nitrique dans des macrophages stimulés avec le LPS. Finalement, l'effet cytotoxique de l'huile essentielle de *T. vulgare* a été évalué sur les carcinomes de poumon humain A-549, les adénocarcinomes de côlon DLD-1 et la lignée de cellules saines WS-1. Les deux huiles ont été trouvées cytotoxiques contre toutes les lignées cellulaires avec des  $\text{IC}_{50}$  supérieures à  $100 \mu\text{g/ml}$ .

**Antibiotic Activity, Inhibition of Nitric Oxide Overproduction, Antioxydant and  
in Vitro Cytotoxicity Effect of Two Chemotypes of *Tanacetum vulgare* L.  
Essential Oil from Québec, Canada**

Marie-Anne Boucher, Héloïse Côté, André Pichette and Jean Legault \*

Laboratoire d'Analyse et de Séparation des Essences Végétales, Université du Québec à Chicoutimi. 555 boulevard de l'Université, Chicoutimi, QC G7G 4B7, Canada.

Keywords: *Tanacetum vulgare*, essential oil, GC, antibacterial activity, anti-inflammatory activity, cytotoxicity activity, antioxidant

\*Corresponding author. Tel.: +1 418 545 5011 ext 2334. Fax: +1 418 545 5012.

E-mail adress: Jean.Legault@uqac.ca

**Abstract**

In this article, two essential oil *Tanacetum vulgare* (EOA and EOB) from two different regions of Quebec (Canada) were analyzed by GC-FID. Main compounds of EOA are camphor (30.1%), borneol (10.7%), 1,8-cineole (10.4%). EOB is mainly composed of  $\beta$ -thujone (73.9%). The antibacterial, cytotoxic, antioxidant and anti-inflammatory activities of these oils and their main compounds were tested. Both oils are inactive against *E. coli* (MIC >300  $\mu$ g) while antibacterial activity against *S. aureus* were identified (EOA MIC<sub>90</sub> = 228  $\pm$  22  $\mu$ g ; EOB MIC<sub>90</sub> = 129  $\pm$  11  $\mu$ g). For both oils, camphor is partly responsible for the activity against *S. aureus* (MIC<sub>90</sub> = 26  $\pm$  3 mg). On the other hand, the two essential oils have shown anti-inflammatory activity by inhibition of nitric oxide production in macrophages stimulated with LPS. Finally, the cytotoxic effect of *T. vulgare* essential oil was evaluated on human lung carcinoma A-549, colon adenocarcinoma DLD-1 and the line of healthy cells WS-1. The two oils were found cytotoxic against all cell lines with IC<sub>50</sub> greater than 100  $\mu$ g/ml.



## 1. Introduction

*Tanacetum vulgare* L. is a perennial herb of the Asteraceae family (Compositae) from Eurasia. *T. vulgare* is well-adapted to the northern climate and grows widely in Europe, Asia, and North America. It was introduced in North America in the eighteenth century, where it became naturalized [1]. Traditionally, this plant has been used in different areas as anthelmintic, tonic, emmenagogue, anti-inflammatory, antihypertensive, carminative, antispasmodic, antidiabetic, and as a diuretic treatment [2,3]. Scientific analyses support that extracts of *T. vulgare* have antimicrobial, antioxidant, anti-inflammatory, antioxidant, antibacterial, antifungal, diuretic and vasodilator properties [4–9]. However, only few researchers focused their work on the biological activity of its essential oil.

There are several studies on the chemical composition of *T. vulgare* essential oil. This plant contains principally monoterpene and other secondary products such as less volatile sesquiterpenes and nonvolatile compounds [10]. Like *Thymus vulgaris*, *Mentha viridis*, *Rosmarinus officinalis* and several other plants, *T. vulgare* reveals highly diversified profiles of essential oils which allow multiple chemotypes assignment [4,10–14]. Until now, no study shows the relationship between the biological activity and the chemotype of *T. vulgare*.

In this study, we analyse essential oil of two different *T. vulgare* chemotypes from Québec, Canada. Antibacterial, anti-inflammatory, antioxidant, and cytotoxicity tests

were conducted to find biological properties of the North American chemotype. The main compounds from two chemotype, including 1,8-cineole, bornyl acetate,  $\alpha$ -humulene,  $\alpha$ -phellandrene,  $\alpha$ -terpinene,  $\beta$ -caryophyllene,  $\alpha$ -pinene,  $\beta$ -pinene,  $\gamma$ -terpinen, p-cymene, camphene, camphor, caryophyllene oxyde, limonene, myrcene, terpinen-4-ol and terpinolene were tested to find those responsible for essential oil activities.

## **2. Materials and methods**

### *2.1 Chemicals*

Standard compounds used for GC analyses or biological tests were supplied by Sigma-Aldrich (1,8-cineole, bornyl acetate,  $\alpha$ -phellandrene,  $\alpha$ -terpinene,  $\beta$ -pinene,  $\alpha$ -pinene,  $\gamma$ -terpinen, p-cymene, camphene, camphor, caryophyllene oxyde, limonene, myrcene, terpinen-4-ol, terpinolene), Fluka ( $\alpha$ -humulene) and Takasago ( $\beta$ -caryophyllene).

### *2.2 Essential oils*

For the first sample (essential oil A), the aerial parts of *T. vulgare* were collected in July 2014 in Chicoutimi, Québec. Voucher specimen No QFA0610840 has been filed at the Louis-Marie herbarium of Laval University, Quebec, Canada. Essential oil was obtained from freshly harvested aerial parts by industrial steam distillation over a 3-

hour (0.23 % (w/w) yield; refractive index = 1.4797; density = 0.92396 g/ml). The second sample of *T. vulgare* (essential oil B) comes from Aliksir, and the plant material was harvested at Portneuf in August 2011, in Québec (refraction index = 1.4590; density = 0.89494 g/ml).

### 2.3 Antibacterial essays

The *in vitro* antimicrobial activities of *T. vulgare* essential oil were tested against gram-negative *E. coli* (ATCC 25922), and gram-positive *S. aureus* (ATCC 25923). The antibacterial test used has been developed in our laboratory, this is ATHC for hydrophobic compounds [38]. All micro-organisms were first left 16–18 hours at 37°C in Nutrient Broth base (Difco). Cellular density of inoculum was obtained by optical densities measured at 600 nm for *E. coli* (Pal *et al.*, 2007) and 660 nm for *S. aureus* (Kaatz *et al.*, 2000) using a Multiscan go UV/Vis microplate spectrophotometer (Labsystems). Inoculum was re-diluted in NB to obtain the required bacterial concentration. Control wells were prepared with bacterial suspension only, bacterial suspension with solvent, and culture medium only. Resazurin sodium salt solution (Sigma R-2127) was added in each well and fluorescence was read on automated 96-well Fluoroskan Ascent F1™ plate reader (Labsystems) after 2 hours for *S. aureus* and 3 hours for *E. coli*. MIC was determined as the lowest concentration result in 90% inhibition of bacterial growth.

#### 2.4 Anti-inflammatory properties

Determination of inhibition NO production by *T. vulgare* essential oil was determined as described in Legault *et al.*, (2010). Control L-NAME was used as positive control. Cells *WS1* were incubated with essential oil or dissolved compounds in DMSO, and then stimulated with 100 ng/mL LPS and incubated at 37° C. After 24 hours, cell-free supernatants were collected, and the NO concentration was immediately determined using the Griess reaction. Absorbance at 540 nm was then measured using an automated Varioskan Ascent plate reader, and the presence of nitrite was quantified by comparison with a NaNO<sub>2</sub> standard curve.

#### 2.5 *In vitro* antioxidant activity cell-based assays

Antioxidant activity was evaluated using the DCFH-DA assay as described by Girard-Lalancette *et al.* (2007). To assess antioxidant activity, the cells were incubated for 1 hour with a growing concentration of essential oil or dissolved compounds in DMSO, and then 100 mL of 200 mM tert-butylhydroperoxide was added. Fluorescence was measured immediately after tert-butylhydroperoxide addition and 90 minutes later, on an automated plate reader (Fluoroskan Ascent FL) using an excitation wavelength of 485 nm and an emission wavelength of 530 nm. Antioxidant activity is expressed as the concentration of extract inhibiting 50% (IC<sub>50</sub>) of DCFH oxidation.

## 2.6 ORAC

The procedure was modified from the method described by Ou *et al.* (2001). Briefly, the ORAC assay was carried out in black 384-well microplates (Nunc) on a Fluoroskan Ascent FL™ plate reader (Labsystems) equipped with an automated injector. Four concentrations of Trolox (the control standard) were used (1.56; 3.13; 6.25 and 12.5  $\mu$ M) in quadruplicate, and a gradient of 16 concentrations of the samples (compounds dissolved in DMSO or pure essential oils) was prepared without replication. The experiment was conducted at 37.5 °C and in pH 7.4 phosphate buffer, with a blank sample in parallel. The fluorimeter was programmed to record the fluorescence ( $\lambda$  ex.: 485 nm/em.: 530 nm) of fluorescein every minute after the addition of 375 mM of 2,2'-azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH), for a total of 60 min. The final results were calculated using the net area under the curves of the sample concentrations for which a decrease of at least 95% of fluorescence was observed at 60 min. ORAC values were expressed in micromoles of Trolox equivalents (TE) per milligram ( $\mu$ mol TE/mg).

## 2.7 Cytotoxicity assays

Exponentially growing cells were plated at a density of  $5 \times 10^3$  cells per well in 96-well microplates (Costar, Corning Inc., Lowell, MA, USA) in 100 mL culture medium and were allowed to adhere for 16 h before treatment. Cells were then treated with *T. vulgare* essential oil or dissolved compounds in DMSO. The final concentration of DMSO in the culture medium was 0.5% (v/v) to avoid solvent toxicity. After 48 h, the

cytotoxicity was assessed using the resazurin reduction test (O'Brien *et al.*, 2000). Fluorescence was measured on an automated 96-well Fluoroskan Ascent FI plate reader (Labsystems, Vienna, VA, USA) using an excitation wavelength of 530 nm and an emission wavelength of 590 nm. Cytotoxicity was expressed as the concentration that inhibited cell growth by 50% (IC<sub>50</sub>).

### *2.8 GC/MS Analysis of the essential oil*

All chromatographic analyzes were run on an Agilent 6890N GC equipped with a non-polar DB-5 column and a polar SolgelWax column (30 m x 0.25 mm x 0.25 mm) as well as two FID detectors. The oils were injected undiluted (0.1  $\mu$ L injection volume, split 1:235) and undried. The temperature program was 40 °C for 2 minutes, 2 °C/minute up to 210 °C, and 210 °C for 13 minutes. Samples were also injected on an Agilent 7890A GC coupled to an Agilent 5975C InertXL EI/CI mass spectrometer, equipped with a DB-5MS column using the same temperature program and a split of 1:1000. Compounds were identified from their retention indexes as calculated from even-numbered C8 to C36 alkane standards and/or from MS databases (NIST08, HPCH 2205 and custom libraries built from pure compounds). Quantification comes from the FID detector response on the DB-5 column without any correction factor. All standards are co-injected to valid the identification.

### 3. Results and Discussion

The EOA of *T. vulgare* was extracted using hydrodistillation method as described in Experimental section. The oil was yellow and odorous. The refraction index is 1.4797 and the density measured by pycnometer is 0.92396 g/mL. These characteristics are different from EOB, which was extracted by Aliksir. The oil was also yellow and odorous, but the refraction index was 1.4590 and the density measured by pycnometer was 0.89494 g/mL.

The composition of *T. vulgare* oils varies markedly and several chemotypes of different geographical origins have already been identified.  $\beta$ -thujone,  $\alpha$ -thujone, camphor-1,8-cineole-borneol, chrysanthenone, dihydrocarvone, artemisia alcohol, camphenol, davadone, lyratol, lyratyl acetate and chrysanthenol are a few examples of chemotypes identified in scientific literature [4,10,14–17]. Until now, chemotype of *T. vulgare* essential oil from Canada was found to contain camphor, chrysanthenone,  $\alpha$ -cubebene, dihydrocarvone, piperitone, terpinen-4-ol,  $\beta$ -thujone,  $\alpha$ -thujone, camphor-1,8-cineole-borneol [10]. In this study, two chemotypes identified in plant growing in Quebec, Canada were analysed (see table 2). EOA main compounds are camphor – borneol – 1,8-cineole (respectively 30.05% - 10.71% - 10.38%), and EOB is  $\beta$ -thujone (73.92%). This two chemotypes have already been identified [10]. The mixed-chemotype is less common; it has only been identified in Canada [10]. However,  $\beta$  -thujone chemotype has often been identified in different countries [10,14,16,18–21]. Our study confirms that chemotypes of *T. vulgare* highly differ in

their composition, and also that predominant compounds in one chemotype can be absent in others [10,16,18,22]. The chemotypes identified were mainly composed of monoterpene (EOA = 89%; EOB = 90%) and sesquiterpene (EOA = 6%; EOB = 5%). In two cases, aliphatic compounds were found in trace. As in other studies, oxygenated terpenes were predominantly present in EOA (73%) and EOB (88%) [10].

Mainly due to the large variety of chemotypes present in *T. vulgare* family, it is difficult to have a good idea of its biological activity. Moreover, there are few studies about antibacterial activity and they mainly focus on qualitative screening. The study of Holetz *et al.* (2002), reports no activity of ethanolic maceration of *T. vulgare* part against *S. aureus*, but a moderate activity against *E. coli* (500 µg/ml). In our study, EOA has low activity against *E. coli* ( $MIC_{90} = 331 \pm 7 \mu g$ ) and *S. aureus* ( $MIC_{90} = 228 \pm 22 \mu g$ ) whereas EOB is inactive against *E. coli* ( $MIC_{90} = > 300$ ) and has moderate activity against *S. aureus* ( $MIC_{90} = 129 \pm 11 \mu g$ ). We tested different main compounds to find those responsible for the antibacterial activity, including bornyl acetate (EOA=5.26%; EOB=0.06%), camphor (EOA=30.05%; EOB=9.96%), 1,8-cineole (EOA=10.38%; EOB=1.60%), camphene (EOA=7.19%; EOB=0.75%),  $\beta$ -pinene (EOA=2.47%; EOB=0.14%),  $\beta$ -caryophyllene (EOA=0.23%; EOB=0.47%), p-cymene (EOA=0.76%; EOB=0.65%),  $\gamma$ -terpinene (EOA=0.57%; EOB=0.23%), terpinen-4-ol (EOA=0.78%; EOB=1.02%), terpinolene (EOA=0.12%; EOB=0.06%),  $\alpha$ -humulene (EOA=<0.05%; EOB=0.06%),  $\alpha$ -phellandrene (EOA=<0.05%;



EOB=<0.05),  $\alpha$ -terpinene (EOA=0.23%; EOB=0.16%), caryophyllene oxide (EOA=0.16%; EOB=0.09%), limonene (EOA=0.14%), and myrcene (EOA=0.08%; EOB=0.05%).

As you can see in table 2, activity against *E. coli* was mainly provided by p-cymene  $\alpha$ -phellandrene (MIC<sub>90</sub> *E. coli* = 10.4  $\pm$  0.6),  $\beta$ -caryophyllene (MIC<sub>90</sub> *E. coli* = 16  $\pm$  1), bornyl acetate (MIC<sub>90</sub> *E. coli* = 21  $\pm$  1), caryophyllene oxide (MIC<sub>90</sub> *E. coli* = 21  $\pm$  1), camphor (MIC<sub>90</sub> *E. coli* = 22  $\pm$  2), (MIC<sub>90</sub> *E. coli* = 26  $\pm$  3). Activity against *S. aureus* was mainly provided by p-cymene (MIC<sub>90</sub> *E. coli* = 5.6  $\pm$  0.2) and camphor (26  $\pm$  3), all value is expressed in  $\mu$ g. The activities of these compounds partly explain all the antibacterial activity. A potential synergy was present between different compounds.

Antibacterial activity of EOA was mainly explained by camphor (30.05%) (MIC<sub>90</sub> *E. coli* = 22  $\pm$  2; MIC<sub>90</sub> *S. aureus* = 26  $\pm$  3), bornyl acetate (5.26%) (MIC<sub>90</sub> *E. coli* = 21  $\pm$  1; MIC<sub>90</sub> *S. aureus* = > 40), p-cymene (0.76%) (MIC<sub>90</sub> *E. coli* = 26  $\pm$  3; MIC<sub>90</sub> *S. aureus* = 5.6  $\pm$  0.2),  $\beta$ -caryophyllene (0.23%) (MIC<sub>90</sub> *E. coli* = 16  $\pm$  1; MIC<sub>90</sub> *S. aureus* = > 40), caryophyllene oxide (0.16%) (MIC<sub>90</sub> *E. coli* = 21  $\pm$  1; MIC<sub>90</sub> *S. aureus* = > 40), and  $\alpha$ -phellandrene (<0.05%) (MIC<sub>90</sub> *E. coli* = 10  $\pm$  1; MIC<sub>90</sub> *S. aureus* = > 40). Activity of EOB is explained by camphor (9.96%) (MIC<sub>90</sub> *E. coli* = 22  $\pm$  2; MIC<sub>90</sub> *S. aureus* = 26  $\pm$  3), p-cymene (0.65%) (MIC<sub>90</sub> *E. coli* = 26  $\pm$  3; MIC<sub>90</sub> *S. aureus* = 5.6  $\pm$  0.2),  $\beta$ -caryophyllene (0.47%) (MIC<sub>90</sub> *E. coli* = 16  $\pm$  1; MIC<sub>90</sub> *S. aureus* = > 40), caryophyllene oxide (0.09%) (MIC<sub>90</sub> *E. coli* = 21  $\pm$  1; MIC<sub>90</sub> *S. aureus* = > 40), bornyl

acetate (0.06%) ( $\text{MIC}_{90}$  *E. coli* =  $21 \pm 1$ ;  $\text{MIC}_{90}$  *S. aureus* =  $> 40$ ), and  $\alpha$ -phellandrene ( $<0.05\%$ ) ( $\text{MIC}_{90}$  *E. coli* =  $10 \pm 1$ ;  $\text{MIC}_{90}$  *S. aureus* =  $> 40$ ). A larger fraction of the essential oil A has been identified as antibacterial (EOA=36.51%; EOB=11.28%); however EOB is more active than EOA. In our study,  $\beta$ -tujone has not been tested. Other studies have shown inhibition of bacterial growth with *E. coli* and *S. aureus* by this compound [24]. This compound potentially provides the antibacterial activity of EOB against both bacterial strains tested.

Methanol extract of *T. vulgare* has already shown antioxidant properties with DPPH radical scavenging effects, mainly due to phenolic compounds ( $\text{EC}_{50}$  =  $37 \pm 1.2$   $\mu\text{g/ml}$ ) [25]. In the study of Juan-Badaturuge *et al.* (2009), this activity is mainly driven by three antioxidant compounds: 3,5-O-dicaffeoylquinic acid (3,5-DCQA), axillarin and luteolin, but these compounds were all absent in EOA and EOB. Regarding the antioxidant activity of essential oils, this is usually attributed to some terpenoid [26]. Although the analysed essential oils contain several terpenes, no antioxidant activity was found with ORAC essay. However, EOA has small antioxidant activity on *in vitro* antioxidant activity cell-based assays (EOA  $\text{IC}_{50}$  =  $48 \pm 8$   $\mu\text{g/ml}$ ), while EOB did not (positive control catechin  $\text{IC}_{50}$  =  $0.02 \pm 0.03$   $\mu\text{g/ml}$ ). This moderate activity can be explained by the low concentration of active compounds. Among the eighteen compounds tested, only myrcene was active ( $\text{IC}_{50}$  =  $31 \pm 4$   $\mu\text{g/ml}$ ) and slightly present in the essential oil (EOA=0.08%; EOB=0.05%). Myrcene by radical scavenging activity is already recognized as an antioxidant [27].

In the study of Schinella *et al.* (1998), compounds that are mainly active in anti-inflammatory process are parthenolide, eupatorin, chrysoeriol and diosmetin; these compounds were not present in EOA-EOB [6]. Nevertheless, a lot of essential oils have anti-inflammatory activity, like *Thymus satureioides* Coss., *Satureja hortensis* L., *Thymus vulgaris* L., and *Rosmarinus officinalis* L. [6,28–31]. Likewise, our essential oils have a good anti-inflammatory activity because of the fact that their value is close to the positive control with an inhibition of 100% (EOA =  $92.6 \pm 0.7\%$ ; EOB =  $92.6 \pm 1.2\%$ ; inhibition percentage of NO at 20  $\mu\text{g/ml}$ ). We have tested the same compounds as for the antibacterial activity. Caryophyllene oxide shows moderate activity ( $56 \pm 5\%$ ) and it is a minor compound in these essential oils (EOA = 0.16%, EOB = 0.09%). This sesquiterpene have already shown anti-inflammatory properties in an other study [32]. Myrcene ( $38 \pm 10$ ),  $\alpha$ -humulene ( $30 \pm 2$ ),  $\alpha$ -pinene ( $30 \pm 4$ ),  $\beta$ -pinene ( $23 \pm 4$ ) and  $\alpha$ -terpinene ( $22 \pm 2$ ) have low activity, and all of these compounds were already described as anti-inflammatory in the scientific literature [33–36]. The activity is brought either by a potential synergy or by untested compounds.

The cell growth inhibition induced by EOA-EOB of *T. vulgare* and its main compounds was assessed against human lung carcinoma A-549, colon adenocarcinoma DLD-1, and healthy cell line WS-1. The results show that essential oils of *T. vulgare* are active, but not selective (EOA (A549 =  $232 \pm 51\ \mu\text{g/ml}$ ; DLD1 =  $105 \pm 18\ \mu\text{g/ml}$ ; WS1 =  $202 \pm 52\ \mu\text{g/ml}$ ), EOB (A549 =  $491 \pm 132\ \mu\text{g/ml}$ ; DLD1 =

226 ± 44 µg/ml; WS1 = 350 ± 109 µg/ml)) (see table 2). Compounds α-pinene (EOA = 4.36%, EOB = 0.26%), α-humulene (EOA = <0.05%, EOB = 0.06%), α-phellandrene (EOA = < 0.05%, EOB = < 0.05%), α-terpinene (EOA = 0.23%, EOB = 0.16%), β-caryophyllene (EOA = 0.23%, EOB = 0.47%), β-pinene (EOA = 2.47%, EOB = 0.14%), γ-terpinene (EOA = 0.57%, EOB = 0.23%), camphene (EOA = 7.19%, EOB = 0.75%), caryophyllene oxide (EOA = 0.16, EOB = 0.09%), limonene (EOA = 0.14%, EOB = 0.0%) and myrcene (EOA = 0.08%, EOB = <0.05%) had moderate cytotoxic activity against in vitro cultured cancer cell lines (table 2), but a pure compound is considered inactive when IC<sub>50</sub> > 20 µg/ml [37]. This product could not be useful for medical treatments against tumour cells because of its higher activity against healthy cells. Some compounds tested in our study were previously tested by Sylvestre *et al.*, (2007), but results from both research are slightly different potentially due to the use of different dilution solvents.

Our results confirmed the in vitro antimicrobial, anti-inflammatory and cytotoxic properties of *T. vulgare* essential oil chemotypes A (EOA) and B (EOB), from Canada. Other chemotypes of *Tanacetum vulgare* could be investigated.

## Acknowledgments

The authors are grateful to Catherine Dusseault and Karl Girard-Lalancette for their help with biological assay and Laboratoire PhytoChemia for their advices about GC/MS. This work was supported by funds from the *Fonds de recherche Nature et technologies*.

**Table 1.** Composition of two chemotypes of *T. vulgare* essential oil

RI		Identified compounds	Relative Concentration <sup>1</sup> (%)	
DB-5	Solgel-Wax		EOA	EOB
903	991	Tricyclene	0.60	-
911	1010	$\alpha$ -Thujene	<0.05	<0.05
917	1006	$\alpha$ -Pinene	4.36	0.26
933	1035	Camphene	7.19	0.75
939	1035	Thuja-2,4(10)-diene	<0.05	-
962	1085	Sabinene	1.99	0.58
965	1069	$\beta$ -Pinene	2.47	0.14
982	1160	dehydro-1,8-Cineole	0.17	-
986	1138	Myrcene	0.08	<0.05
1001	1131	$\alpha$ -Phellandrene	<0.05	<0.05
1011	1148	$\alpha$ -Terpinene	0.23	0.16
1019	1242	p-Cymene	0.76	0.65
1023	1172	Limonene	0.14 <sup>2</sup>	-
1025	1181	1,8-Cineole	10.38 <sup>2</sup>	1.60
1045	1233	<i>trans</i> - $\beta$ -Ocimene	<0.05	<0.05
1053	1222	$\gamma$ -Terpinene	0.57	0.23
1061	1443	<i>cis</i> -Sabinene hydrate	0.11	-
1082	1254	Terpinolene	0.12	0.06
1096	1405	Filifolone	0.47	-
1097	1524	<i>trans</i> -Sabinene hydrate	<0.05	-
1100	1531	Linalol	<0.05	-
1102	1386	$\alpha$ -Thujone	0.07	-
1109	1405	$\beta$ -Thujone	3.76	73.92
1117	1468	Chrysanthenone	4.97	-
1119	1619	<i>trans</i> -para-Mentha-2,8-dien-1-ol	<0.05	-

RI		Identified compounds	Relative Concentration <sup>1</sup> (%)	
DB-5	Solgel-Wax		EOA	EOB
1132	1614	<i>trans</i> -Pinocarveol	0.31	-
1136	1471	Camphor	30.05	9.96
1138	1643	<i>trans</i> -Verbenol	0.13	-
1153	1522	Pinocarvone	1.05	<0.05
1160	1651	<i>cis</i> -Chrysanthanol	-	0.25
1160	1664	Borneol	10.71	-
1171	1570	Terpinen-4-ol	0.78	1.02
1176	1601	Thuj-3-en-10-al	<0.05	0.10
1185	1667	$\alpha$ -Terpineol	0.47	-
1187	1579	Myrtenal	0.41	-
1190	1752	Myrténol	0.34	-
1216	1799	<i>trans</i> -Carveol	<0.05	<0.05
1221	1765	<i>cis</i> -p-Mentha-1(7),8-dien-2-ol	-	<0.05
1237	1747	Cumin aldehyde	<0.05	0.08
1238	1678	Carvone	-	<0.05
1240	1661	Carvotanacetone	-	0.28
1257	1539	<i>cis</i> -Chrysanthenyl acetate	0.09	-
1282	1545	Bornyl acetate	5.26	0.06
1290	1625	<i>trans</i> -Sabinyle acetate	<0.05	-
1335	1448	$\alpha$ -Cubebene	-	<0.05
1352	2113	Eugenol	0.14	-
1370	1648	Isobornyl propionate	0.09	-
1378	1494	$\beta$ -Bourbonene	-	<0.05
1391	1880	<i>cis</i> -Jasmone	<0.05	-
1411	1556	$\beta$ -Caryophyllene	0.23	0.47
1422	1545	$\beta$ -Copaene	-	<0.05
1446	1629	$\alpha$ -Humulene	<0.05	0.06
1455	1654	<i>trans</i> - $\beta$ -Farnesene	<0.05	-
1470	1664	Selina-4,11-diene	<0.05	-
1475	1667	Germacrene D	2.32	3.80
1482	1674	$\beta$ -Selinene	0.09	-
1491	1690	Bicyclogermacrene	0.20	0.28
1496	1698	$\alpha$ -Muurolene	<0.05	0.06
1505	1701	$\beta$ -Bisabolene	-	<0.05
1499	1735	Germacrene A	<0.05	-
1503	1721	$\delta$ -Amorphene	-	0.14
1509	1719	$\gamma$ -Cadinene (1513)	<0.05	<0.05
1519	1742	$\beta$ -Sesquiphellandrene	0.08	-
1522	1728	$\delta$ -Cadinene	0.09	-
1536	1865	$\alpha$ -Calacorene	<0.05	<0.05
1569	2075	Spathulenol	<0.05	0.10
1573	1922	Caryophyllene oxide	0.16	0.09

RI		Identified compounds	Relative Concentration <sup>1</sup> (%)	
DB-5	Solgel-Wax		EOA	EOB
1593	1976	Ledol	0.16	-
1597	1970	Rosifoliol	<0.05	-
1599	2037	Unknown <sup>3</sup>	0.55	-
1621	2019	Unknown <sup>4</sup>	1.01	-
1622	2015	1- <i>epi</i> -Cubenol	-	<0.05
1624	2124	γ-Eudesmol	<0.05	-
1631	2138	τ-Muurolol	<0.05	-
1635	2131	τ-Cadinol	<0.05	-
1641	2171	β-Eudesmol	0.63	0.14
1647	2178	α-Cadinol	<0.05	-
1663	2044	Valeranone	0.06	-
1713	1880	Pentadecanal	<0.05	-
Total			93.69	95.66

<sup>1</sup>RI: Retention indices were obtained with DB-5 column

<sup>2</sup>RI: Retention indices were obtained with Solgel-Wax column

<sup>3</sup>Non-identified compound: MS fragmentation peaks 121, 164 (43), 93 (28), 161 (25), 70 (22), 109 (18), 105 (17)...2 (14) m/z

<sup>4</sup>Non-identified compound: MS fragmentation peaks 121, 164 (93), 105 (43), 79 (42), 93 (41), 161 (33)...222 (4) m/z

**Table 2:** Antibacterial activity using the ATHC test, cytotoxic activity and determination of inhibition NO production of *T. vulgare* essential oil and its main compounds

Compounds	Antibact�rial			Cytotoxicity		Anti-inflammatory Percent Inhibition of NO at 20 µg/ml (%)
	MIC <sub>90</sub> (µg)			IC <sub>50</sub> (ug/ml)		
	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>A549</i>	<i>DLD1</i>	<i>WS1</i>	
Essential oil A	> 300	228 ± 22	232 ± 51	105 ± 18	202 ± 52	92.6 ± 0.7
Essential oil B	> 300	129 ± 11	491 ± 132	226 ± 44	350 ± 109	93 ± 1
1,8-Cineole	> 40	> 40	> 200	> 200	> 200	NA
�-Humulene	> 40	> 40	28 ± 1	43 ± 3	24 ± 3	30 ± 2
�-Phellandrene	10 ± 1	> 40	68 ± 3	83 ± 18	53 ± 32	NA
�-Pinene	ND	ND	35 ± 6	58 ± 18	57 ± 4	30 ± 4
�-Terpinene	> 40	> 40	63 ± 10	73 ± 7	53 ± 12	22 ± 2
�-Caryophyllene	16 ± 1	> 40	55 ± 5	97 ± 6	59 ± 7	NA
�-Pinene	> 40	> 40	43 ± 4	49.4 ± 0.3	29 ± 14	23 ± 4
�-Terpinene	> 40	> 40	112 ± 15	> 200	82 ± 15	NA
p-Cymene	26 ± 3	5.6 ± 0.2	> 200	> 200	> 200	NA
Borneol	> 40	> 40	> 200	> 200	> 200	NA
Bornyl acetate	21 ± 1	> 40	> 200	> 200	> 200	NA
Camphene	> 40	> 40	72 ± 2	75 ± 5	49 ± 1	NA
Camphor	22 ± 1	26 ± 3	> 200	> 200	> 200	NA
Caryophyllene oxide	21 ± 1	> 40	36 ± 2	43 ± 3	50 ± 4	56 ± 5
Limonene	> 40	> 40	71 ± 6	31 ± 3	53 ± 12	NA
Myrcene	> 40	> 40	67 ± 4	56 ± 6	36 ± 3	38 ± 10
Terpinen-4-ol	> 40	> 40	> 200	> 200	> 200	NA
Terpinolene	> 40	> 40	> 200	> 200	> 200	NA

ND: Not determined

NA: Not active



## References

- [1] Mitich WL. Tansy [Internet]. *Food Agriculture Organisation of the United Nations*. [cited 2014 Jul 17]. Available from: <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US9319817>.
- [2] Lahlou S, Tangi KC, Lyoussi B, Morel N. **(2008)** Vascular effects of *Tanacetum vulgare* L. leaf extract: In vitro pharmacological study. *Journal of Ethnopharmacology*, **120**, 98–102.
- [3] Duke JA. Handbook of medicinal herbs. Second Edi. CRC Press; 1985. p. 896. .
- [4] Chiasson H, Bélanger A, Bostanian N, Vincent C, Poliquin A. **(2001)** Acaricidal properties of *Artemisia absinthium* and *Tanacetum vulgare* (asteraceae) essential oils obtained by three methods of extraction. *Journal of Economic Entomology*, **94**, 167–171.
- [5] Izzo AA, Carlo G Di, Biscardi D, Fusco R De, Mascolo N, Borrelli F, Capasso F. **(1995)** Biological screening of Italian medicinal plants for antibacterial activity. *Phytotherapy Research*, **9**, 281–286.
- [6] Schinella GR, Giner RM, Recio MC, Mordujovich de Buschiazzi P, Ríos JL, Máñez S. **(1998)** Anti-inflammatory effects of South American *Tanacetum vulgare*. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, **50**, 1069–1074.
- [7] Rosselli S, Bruno M, Raimondo FM, Spadaro V, Varol M, Koparal AT, Maggio A. **(2012)** Cytotoxic effect of eudesmanolides isolated from flowers of *Tanacetum vulgare* ssp. siculum. *Molecules*, **17**, 8186–8195.
- [8] Scheerer WR. **(1984)** Components of oil of Tansy (*Tanacetum vulgare*) that repel colorado potato beetles (*Leptinotarsa Decemlineata*). *Journal of Natural Products*, **47**, 964–969. .
- [9] Pålsson K, Jaenson TGT, Bäckström P, Borg-Karlson A-K. **(2008)** Tick repellent substances in the essential oil of *Tanacetum vulgare*. *Journal of Medical Entomology*, **45**, 88–93.
- [10] Collin GJ, Deslauriers H, Pageau N, Gagnon M. **(1993)** Essential Oil of Tansy (*Tanacetum vulgare* L.) of Canadian Origin. *Journal of Essential Oil Research*, **5**, 629–638.

- [11] Joshi RK, Sharma AK. **(2014)** cis -Ocimenone chemotype essential oil of green mint (*Mentha viridis* L .) from Western Ghats region of North West Karnataka, *Indian Journal of Plant Sciences*, **1**, 10–12.
- [12] Matsuzaki Y, Tsujisawa T, Nishihara T, Nakamura M, Kakinoki Y. **(2013)** Antifungal activity of chemotype essential oils from rosemary against *Candida albicans*. *Open Journal of Stomatology*, **3**, 176–182.
- [13] Thompson JD, Chalchat J-C, Michet A, Linhart YB, Ehlers B. **(2003)** Qualitative and quantitative variation in monoterpene co-occurrence and composition in the essential oil of *Thymus vulgaris* chemotypes. *Journal of Chemical Ecology*, **29**, 859–880.
- [14] Tétényl P, Kaposi P, Héthelyi E. **(1975)** Variations in the essential oils of *Tanacetum vulgare*. *Phytochemistry*, **14**, 1539–1544.
- [15] Gallino M. **(1988)** Essential oil from *Tanacetum vulgare* growing spontaneously in Tierra del fuego (Argentina). *Planta Medica*, **52**, 182.
- [16] Héthelyi E, Tétényl P, Kettenes-Van Den Bosch JJ, Salemink CA, Heerma W, Versluis C, Kloosterman J, Sipma G. **(1981)** Essential oils of five *Tanacetum Vulgare* genotypes. *Phytochemistry*, **20**, 1847–1850.
- [17] Nano GM, Bicchi C, Frattini C, Gallino M. **(1979)** Wild Piedmontese plants-a rare chemotype of *Tanacetum vulgare* L., abundant in Piedmont (Italy). *Planta medica*; **35**, 270–274.
- [18] Rohloff J, Mordal R, Dragland S. **(2004)** Chemotypical variation of tansy (*Tanacetum vulgare* L.) from 40 different locations in Norway. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **52**, 1742–1748.
- [19] Keskitalo M, Pehu E, Simon J. **(2001)** Variation in volatile compounds from tansy (*Tanacetum vulgare* L.) related to genetic and morphological differences of genotypes. *Biochemical Systematics and Ecology*, **29**, 267–285.
- [20] Hendricks H, Van der Elst DJD, Van Putten FMS, Bos R. **(1990)** The essential oils of dutch tansy (*Tanacetum vulgare* L.). *Journal of essential oil Research*, **2**, 155–162.

- [21] De Pooter HL, Vermeesch J, Schamp NM. **(1989)** The essential oils of *Tanacetum vulgare* L. and *Tanacetum parthenium* (L.) Scultz-Bip. *Journal of Essential Oil Research*, **1**, 9–13.
- [22] Banthorpe D V., Cardemil E, Contreras MDC. **(1976)** Purification and properties of alcohol oxidase from *Tanacetum Vulgare*. *Phytochemistry*, **15**, 391–394.
- [23] Holetz FB, Pessini GL, Sanches NR, Cortez DAG, Nakamura CV, Filho BPD. **(2002)** Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, **97**, 1027–1031.
- [24] Sivropoulou A, Nikolaou C, Papanikolaou E, Kokkini S, Lanaras T, Arsenakis M. **(1997)** Antimicrobial, cytotoxic and antiviral activities of *Salvia fruticosa* essential oil. *Journal of Agricultural Food and Chemistry*, **45**, 3197–3201.
- [25] Juan-Badaturuge M, Habtemariam S, Jackson C, Homas MJK. **(2009)** Antioxidant principles of *Tanacetum vulgare* L. aerial parts. *Natural Product Communications*, **4**, 1561–1564.
- [26] Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M. **(2008)** Biological effects of essential oils - A review. *Food and Chemical Toxicology Journal*, **46**, 446–475.
- [27] Mitić-Culafić D, Zegura B, Nikolić B, Vuković-Gaćić B, Knezević-Vukcević J, Filipic M. **(2009)** Protective effect of linalool, myrcene and eucalyptol against t-butyl hydroperoxide induced genotoxicity in bacteria and cultured human cells. *Food and Chemical Toxicology Journal*, **47**, 260–266.
- [28] Hajhashemia V, Ghannadib A, Pezeshkian SK. **(2002)** Antinociceptive and anti-inflammatory effects of *Satureja hortensis* L. extracts and essential oil. *Journal of Ethnopharmacology*, **82**, 83–87.
- [29] Ismaili H, Milella L, Fkih-Tetouani S, Ildrissi A, Camporese A, Sosa S, Altinier G, Della Loggia R, Aquino R. **(2004)** In vivo topical anti-inflammatory and in vitro antioxidant activities of two extracts of *Thymus satureioides* leaves. *Journal of Ethnopharmacology*, **91**, 31–36.
- [30] Takaki LE, Bersani-Amado, A. Vendruscolo SM, Sartoretto SP, Diniz CA, Bersani-Amado, Cumin RKN. **(2008)** Anti-Inflammatory and Antinociceptive

Effects of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil in experimental animal models. *Journal of Medicinal Food*, **11**, 741–746.

- [31] Fachini-Queiroz FC, Kummer R, Estevão-Silva CF, Carvalho MDDDB, Cunha JM, Grespan R, Bersani-Amado CA, Cuman RKN. **(2012)** Effects of thymol and carvacrol, constituents of *Thymus vulgaris* L. essential Oil, on the inflammatory response. *Evidence-based Complementary Alternative Medicine*, **2012**, 10.
- [32] Chavan MJ, Wakte PS, Shinde DB. **(2010)** Analgesic and anti-inflammatory activity of Caryophyllene oxide from *Annona squamosa* L. bark. *Phytomedicine*, **17**, 149–151.
- [33] Fernandes ES, Passos GF, Medeiros R, Da Cunha FM, Ferreira J, Campos MM, Pianowski LF, Calixto JB. **(2007)** Anti-inflammatory effects of compounds alpha-humulene and (-)-trans-caryophyllene isolated from the essential oil of *Cordia verbenacea*. *European Journal of Pharmacology*, **569**, 228–236.
- [34] Zhou J-Y, Tang F, Mao G, Bian R. **(2004)** Effect of alpha-pinene on nuclear translocation of NF-kappa B in THP-1 cells. *Acta Pharmacologica Sinica*, **25**, 480–484.
- [35] Sayyah M, Saroukhani G, Peirovi A, Kamalinejad M. **(2003)** Analgesic and anti-inflammatory activity of the leaf essential oil of *Laurus nobilis* Linn. *Phytotherapy Research*, **17**, 733–736.
- [36] Tubaro A, Del Negro P, Ragazzi E, Zampiron S, Della Loggia R. **(1988)** Anti-inflammatory and peripheral analgesic activity of esculetin in vivo. *Pharmacological Research Communications*, **20**, 83–85.
- [37] Sylvestre M, Pichette A, Lavoie S, Longtin A, Legault J. **(2007)** Composition and cytotoxic activity of the leaf essential oil of *Comptonia peregrina* ( L .) Coulter. *Phytotherapy Research*, **21**, 536–540.
- [38]. Coté H, Boucher M-A, Roger B, Pichette A, Legault J. **(In review)** Antibacterial potential of whole *Abies balsamea* oleoresin used in Amerindian traditional medicine. *Journal of Natural Products*
- [39] Pal S, Tak YK, Song JM. **(2007)** Does the antibacterial activity of silver nanoparticles depend on the shape of the nanoparticle? A study of the

Gram-negative bacterium *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, **73**, 1712–1720.

- [40] Kaatz GW, Seo SM, Brien LO, Foster TJ, Wahiduzzaman M. **(2000)** Evidence for the existence of a multidrug efflux transporter distinct from norA in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, **44**, 1404–1406.
- [41] Ou B, Hampsch-Woodill M, Prior RL. **(2001)** Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **49**, 4619–4626.

## CHAPITRE 5

### SOMMAIRE DES TRAVAUX NON PUBLIÉS

Ce chapitre est consacré aux travaux de ce projet qui n'ont pas été présentés dans les articles des chapitres 3 et 4. Un criblage biologique (évaluation du potentiel antibactérien) et chimique des huiles essentielles de 17 plantes de la forêt boréale a été réalisé. Ce chapitre présente les résultats obtenus pour les 15 autres huiles essentielles ne faisant pas partie des articles scientifiques, soit celles extraites d'*Achillea millefolium* L. (1), *Agrimonia striata* Michx (2), *Aralia nudicaulis* L. (3), *Arctium lappa* L. (4), *Comptonia peregrina* (L.) Coulter (5), *Empetrum nigrum* L. (6), *Epilobium angustifolium* L. (7), *Ledum groenlandicum* Retzius (8), *Myrica gale* L. (9), *Pinus strobus* L. (10), *Populus tremuloides* Michx. (11), *Plantago major* L. (12), *Prunus virginiana* L.f. (13), *Rhus typhina* L. (14), *Thuja occidentalis* L. (15).

La méthodologie est présentée à la section 5.1 et les résultats à la section 5.2.

## **5.1 Méthodologie**

### **5.1.1 Récolte du matériel végétal**

*Achillea millefolium* L., *Agrimonia striata* Michx, *Aralia nudicaulis* L., *Arctium lappa* L., *Comptonia peregrina* (L.) Coulter, *Empetrum nigrum* L., *Epilobium angustifolium* L., *Ledum groenlandicum* Retzius, *Myrica gale* L., *Pinus strobus* L., *Populus tremuloides* Michx., *Plantago major* L., *Prunus virginiana* L.f., *Rhus typhina* L., *Thuja occidentalis* L. ont été recueillis du mois de mai au mois d'août

2012, dans la région du Saguenay Lac-Saint-Jean et sur la Côte-Nord (voir tableau 7). Tous les spécimens végétaux ont été identifiés par la biologiste Héroïse Côté.

Tableau 6. Lieux et dates de récolte des différentes plantes étudiées

Nom latin	Nom commun	Date de récolte	Lieu de récolte	Coordonnées géographiques	
<i>Pinus strobus</i> L.	Pin blanc	26-mai-12	Chicoutimi	48° 19' 59,405" N	71° 4' 48,529" W
<i>Populus tremuloides</i> Michx.	Peuplier faux-tremble	22-mai-12	Chicoutimi	48° 28,835' N	70° 59,8841' W
<i>Prunus pensylvanica</i> L.f.	Cerisier de Pennsylvanie	26-mai-12	Saint-Honoré	48° 33' 37,35" N	70° 04' 31,33" W
<i>Rhus typhina</i> L.	Sumac vinaigrier	01-juin-12	Chicoutimi	48° 26' 49,47" N	70° 03' 30,81" W
<i>Comptonia peregrina</i> (L.) Coulter	Comptonie voyageuse	10-juin-12	La Doré	48° 44' 989" N	71° 54,215' W
<i>Ledum groenlandicum</i> Retzius	Thé du Labrador	14-juin-12	Saint-Honoré	48° 30,587' N	71° 0,726' W
<i>Myrica gale</i> L.	Myrique baumier	02-juil-12	Saint-Fulgence	48° 27,358' N	71° 0,615' W
<i>Aralia nudicaulis</i> L.	Aralie à tige nue	20-juin-12	Saint-Fulgence	48° 27' 06,04" N	70° 50' 57,60" W
<i>Plantago major</i> L.	Plantain majeur	02-juil-12	Saint-Fulgence	48° 27' 12,17" N	70° 54' 20,06" W
<i>Épilobium angustifolium</i> L.	Épilobe à feuilles étroites	09-juil-12	Chicoutimi	48° 27,845' N	70° 59,587' W
<i>Achillea millefolium</i> L.	Achillée millefeuille	09-juil-12	La Doré	48° 41' 53,82" N	71° 42' 36,88" W
<i>Arcticum lappa</i> L.	Barbane majeure	23-juil-12	Chicoutimi	48° 27,756' N	70° 59,819' W
<i>Agrimonia striata</i> Michx	Aigremoine striée	31-juil-12	Chicoutimi	48° 27' 32,49" N	71° 07' 04,19" W
<i>Thuja occidentalis</i> L.	Cèdre	22-août-12	Chicoutimi	48° 23' 31,70" N	71° 3' 28,584" W
<i>Empetrum nigrum</i> L.	Camarine noire	23-août-12	Tadoussac	48° 09' 20,54" N	69° 39' 49,17" W
<i>Tussilago farfara</i> L.	Tussilage	22-mai-12	Saint-Fulgence	48° 29' 88,9" N	70° 50' 46,4" W
<i>Tanacetum vulgare</i> L.	Tanaisie vulgaire	30-juil-12	Chicoutimi	48° 26' 6,1" N	70° 57' 52,0" W



### 5.1.2 Extraction des huiles essentielles

Les plantes ont été distillées par entraînement à la vapeur pendant une période de 3 heures (pour plus d'informations sur la méthode de distillation, voir la section 2.3.1). Les huiles et les phases aqueuses (hydrolats) ont été séparées en utilisant une ampoule à décantation.



Figure 6. Système d'extraction des huiles essentielles par entraînement à la vapeur

### 5.1.3 Caractérisation chimique des huiles essentielles

Les analyses chromatographiques ont été réalisées sur un système de chromatographie gazeuse avec détection de masse (GC/MS). La séparation des

composés a été effectuée avec une colonne polaire (Solgel-Wax) et une colonne apolaire (DB-5MS) (longueur de 30 m; diamètre interne de 0,25 mm; épaisseur du film de 0,25µm). Les échantillons ont été préparés avec 10 µl/ml d'huile essentielle diluée dans l'hexane. Trois microlitres de cette préparation ont été injectés (splitless) dans l'appareil chauffé à 40 °C pendant deux minutes. Par la suite, la température a été augmentée graduellement de 2 °C/minute jusqu'à une température de 210 °C gardée stable pendant 33 minutes.

#### **5.1.4 Identification des composés**

Les différents composés ont été identifiés à partir de leur indice de rétention selon Kovats, sur deux types de colonnes (Adams, 2007). De plus, tous les spectres MS obtenus ont été comparés à des bases de données disponibles au laboratoire LASEVE (Wiley 6n et NIST08) afin de confirmer leur identité.

#### **5.1.5 Évaluation de l'activité antibactérienne des huiles essentielles**

L'activité antibactérienne a été évaluée à l'aide d'une souche bactérienne Gram négatif *Escherichia coli* (ATCC 25922), ainsi que d'une souche Gram positif, *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923). La méthode utilisée est décrite par Côté *et al.* (*article en préparation*). En bref, des concentrations décroissantes des huiles essentielles dissoutes dans le méthanol (MeOH) ont été déposées dans des plaques de 96 puits contenant un milieu de nutrient broth-agar. Après l'évaporation du

solvant (MeOH), les bactéries, préalablement mises en solution dans du milieu de culture, ont été ensemencées dans des plaques 96 puits. Suite à une incubation de 5 h à 37 °C, une solution de résazurine a été ajoutée à chacun des puits et la plaque a été incubée pendant 2 h pour *S. aureus* et 3 h pour *E. coli*. La fluorescence a été mesurée avec un lecteur de plaque Fluoroskan Ascent FI en utilisant une longueur d'onde d'excitation de 530 nm et une longueur d'onde d'émission de 590 nm.

## **5.2 Résultats**

### **5.2.1 Rendement d'extraction des huiles essentielles**

Suite à l'extraction par entraînement à la vapeur des plantes ciblées, de l'huile essentielle a été recueillie. Les rendements d'extraction sont variables en fonction des différentes plantes utilisées. Tel que présenté dans le tableau 7, plusieurs espèces n'ont pas fourni d'huile essentielle. De plus, pour la majorité des espèces végétales, les quantités d'huile essentielle obtenues sont faibles. Par contre, le rendement de production d'huile est nettement supérieur pour le cèdre (2,42 %) ainsi que pour le thé du Labrador (1,15 %).

Tableau 7. Rendement d'extraction des huiles essentielles

Nom latin	Nom commun	Partie de la plante utilisée	Rendement (%) (m/m)	Indice de réfraction
<i>Pinus strobus</i> L.	Pin blanc	Aiguilles, fleurs et branches	0,34	1,4794
<i>Populus tremuloides</i> Michx.	Peuplier faux-tremble	Feuilles et petites branches	0	-
<i>Prunus pensylvanica</i> L.f.	Cerisier de Pennsylvanie	Feuilles, fleurs et petites branches	0	-
<i>Rhus typhina</i> L.	Sumac vinaigrier	Feuilles, fleurs et petites branches	0	-
<i>Comptonia peregrina</i> (L.) Coulter	Comptonie voyageuse	Feuilles et petites branches	0,14	1,4911
<i>Ledum groenlandicum</i> Retzius	Thé du Labrador	Feuilles et petites branches	1,15	1,4808
<i>Myrica gale</i> L.	Myrique baumier	Feuilles, fruits et petites branches	0,54	1,4874
<i>Aralia nudicaulis</i> L.	Aralie à tige nue	Feuilles et sommités fleuries	Trace	-
<i>Plantago major</i> L.	Plantain majeur	Feuilles et sommités fleuries	0	-
<i>Épilobium angustifolium</i> L.	Épilobe à feuilles étroites	Feuilles, tiges et sommités fleuries	0	-
<i>Achillea millefolium</i> L.	Achillée millefeuille	Parties aériennes fleuries	0,37	1,5555
<i>Arcticum lappa</i> L.	Bardane majeur	Feuilles, tiges et sommités fleuries	0	-
<i>Agrimonia striata</i> Michx	Aigremoine striée	Parties aériennes	0	-
<i>Thuja occidentalis</i> L.	Cèdre	Feuilles et petites branches	2,42	1,4611
<i>Empetrum nigrum</i> L.	Camarine noire	Feuilles, tiges et quelques fruits secs	0	-
<i>Tussilago farfara</i> L.	Tussilage	Fleurs et tiges	0,08	1,4534
<i>Tanacetum vulgare</i> L.	Tanaisie vulgaire	Fleurs et tiges	0,23	1,4797

### 5.2.2 Activités antibactériennes des huiles essentielles

Toutes les huiles essentielles obtenues ont été testées pour leur activité antibactérienne contre une souche bactérienne Gram positif (*S. aureus*) et une souche bactérienne Gram négatif (*E. coli*). Les résultats présentés dans le tableau 8 montrent que toutes les huiles essentielles sont actives.

Tableau 8. Évaluation de l'activité antibactérienne des différentes huiles essentielles

Nom latin	Nom commun	CMI <sub>90</sub> (µg/puit)	
		<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>
<i>Pinus strobus</i> L.	Pin blanc	+++	+
<i>Comptonia peregrina</i> (L.) Coulter	Comptonie voyageuse	+	+++
<i>Ledum groenlandicum</i> Retzius	Thé du Labrador	+	+
<i>Myrica gale</i> L.	Myrique baumier	-	+
<i>Achillea millefolium</i> L.	Achillée millefeuille	++	+++
<i>Thuja occidentalis</i> L.	Cèdre	+	+++
<i>Tanacetum vulgare</i> L.	Tanaisie vulgaire	-	+
<i>Tussilago farfara</i> L.	Tussilage	-	++

- : pas actif à 300µg/puit; + : légèrement actif; ++ : actif, +++ : très actif

Les résultats présentés au tableau 8 indiquent que les huiles essentielles de pin blanc et d'achillée millefeuille sont actives contre *E. coli* tandis que celles de comptonie voyageuse, d'achillée millefeuille et de cèdre sont actives contre *S.*

*aureus*. Un peu surprenant par rapport aux résultats observés avec le *S.aureus* sensible dans le projet, les travaux de Wiley *et al.*, (2008) indiquent que l'huile essentielle de *L. groenlandicum* inhibe de manière significative la croissance de *S. aureus* résistant à la méthyciline (SARM). Les résultats observés avec l'achillée millefeuille sont corroborée par les travaux du groupe de Candan *et al.* (2003). En effet, ces chercheurs ont démontré que l'huile essentielle d'achillée millefeuille provenant de Turquie montrait une activité antibactérienne contre *S. aureus* (CMI = 72 mg/ml), *Streptococcus pneumoniae* (4.5 mg/ml), *Bacillus cereus* (72 mg/ml), *Acinetobacter lwoffii* (18 mg/ml), *Enterobacter aerogenes* (72 mg/ml), *Klebsiella pneumonia* (72 mg/ml), *Clostridium perfringens* (4.5 mg/ml) et *Mycobacterium smegmatis* (9 mg/ml) (Candan *et al.*, 2003).

Aucun article scientifique ne fait état de l'activité antibactérienne des huiles essentielle de *Pinus strobus*, *Myrica gale*, *Thuja occidentalis* et de *Comptonia peregrina*.

### 5.2.3 Caractérisation chimique des huiles essentielles

Les huiles essentielles obtenues ont été caractérisées par GC/MS, tel que décrit précédemment. Elles sont toutes majoritairement composées de monoterpènes et de sesquiterpènes fonctionnalisés.

Le tableau 9 montre les composants de l'huile essentielle d'achillée millefeuille. L'huile essentielle est composée à 49,1 % de monoterpènes, les principaux étant le  $\beta$ -pinène (6,3 %), le sabinène (5,6 %), le  $\alpha$ -phellandrène (5,9 %) et le myrcène (5,6 %). Les sesquiterpènes, pour leur part, composent 21,0 % de l'huile. Ceux qui y sont majoritaires sont le germacrène D (6,7 %), le (E)-caryophyllène (4,5 %) et le *cis*-guaia-3.9-dien-11-ol (2,7 %). Le chamazulène, un composé aromatique dérivé de l'azulène qui se forme lors du processus d'extraction et qui donne la couleur bleue caractéristique à l'huile essentielle, a une concentration relative de 16,1 %. L'analyse présentée au tableau 9 est représentative des travaux des groupes de Chandler (Chandler *et al.*, 1982) et de Orav (Orav *et al.*, 2001).

Tableau 9. Caractérisation chimique par GC/MS des composés de l'huile essentielle d'achillée millefeuille

Composés	IR		Concentration (% relatif) <sup>a</sup>
	DB-5	SolGel-Wax	
Tricyclène	922	-	0,1
$\alpha$ -Thujène	929	1015	0,3
$\alpha$ -Pinène	934	1009	1,9
Camphène	948	1052	2,3
Sabinène	977	1095	5,6 <sup>b</sup>
$\beta$ -Pinène	980	1113	6,3 <sup>b</sup>
Myrcène	994	1159	5,6
$\alpha$ -Phellandrène	1004	1153	5,9
$\alpha$ -Terpinène	1016	1165	0,4
p-Cymène	1026	1257	1,5
Limonène	1030	1181	1,2 <sup>b</sup>
1,8-Cinéole	1034	1188	3,9
(E)- $\beta$ -Ocimène	1057	1244	0,2
$\gamma$ -Terpinène	1067	1231	1,9

Composés	IR		Concentration (% relatif) <sup>a</sup>
	DB-5	SolGel-Wax	
<i>cis</i> -Sabinène hydrate	1074	1447	0,2
Terpinolène	1096	1270	0,2
<i>trans</i> -Sabinène hydrate	1107	1527	<0,1
<i>cis</i> -Thujone	1113	1389	1,3
<i>trans</i> -Thujone	1126	1408	3,3
Camphor	1149	1481	3,9
Bornéol	1167	1662	0,8
Terpinen-4-ol	1177	1572	0,4
$\alpha$ -Terpinéol	1188	-	0,3
Cumin aldéhyde	1239	1729	<0,1
Acétate de bornyle	1290	1552	1,5
$\alpha$ -Copaène	1370	1469	0,2
$\beta$ -Bourbonène	1377	1493	<0,1
$\beta$ -Cubébène	1383	1517	<0,1
( <i>E</i> )-Caryophyllène	1410	1563	4,5
$\alpha$ -Humulène	1445	1625	0,8
( <i>E</i> )- $\beta$ -Farnesène	1460	1645	0,3
Germacrène D	1480	1667	6,7
Bicyclogermacrène	1492	1688	0,5
$\alpha$ -Murolène	1497	1685	0,4
$\delta$ -Amorphène	1504	1716	<0,1
( <i>E,E</i> )- $\alpha$ -Farnesène	1510	1723	0,5
Élémol	1546	2029	0,8
( <i>E</i> )-Nérolidol	1562	2003	0,6
Spathulenol	1568	2065	0,2
Oxide de caryophyllène	1571	1919	0,8
Guaiol	1587	2037	0,2
Fokiéol	1593	2129	0,9
<i>cis</i> -Guaia-3,9-dien-11-ol	1644	2183	2,7
$\alpha$ -Cadinol	1647	2166	0,6
Germacra-4(15),5,10(14)-trien-1 $\alpha$ -ol	1680	2222	0,4
Chamazulène	1732	2301	16,1
Total			86,2

<sup>a</sup> Valeurs obtenues par l'élution sur la colonne DB-5

<sup>b</sup> Valeurs obtenues par l'élution sur la colonne solgel-Wax



L'huile essentielle de *comptonie voyageuse* présentée au tableau 10 est composée de 22,4 % de monoterpènes et de 50,1 % de sesquiterpènes. Les principaux monoterpènes sont le myrcène (6,4 %) et le 1,8-cinéole (4,0 %). Les sesquiterpènes majoritaires sont, pour leur part, le (*E*)-caryophyllène (20,6 %), le (*E*)-nérolidol (3,7 %) et le  $\delta$ -cadinène (3,2 %). La composition est similaire à celles retrouvées dans les autres études traitant de cette plante (Coulter *et al.*, 1988; Lawrence & Weaver, 1974; Sylvestre *et al.*, 2007).

Tableau 10. Caractérisation chimique par GC/MS des composés de l'huile essentielle de *comptonie voyageuse*

Composés	IR		Concentration (% relatif) <sup>a</sup>
	DB-5	SolGel-Wax	
Tricyclène	921	-	<0,1
$\alpha$ -Thujène	929	1015	0,2
$\alpha$ -Pinène	934	1009	1,9
Camphène	947	1051	<0,1
Sabinène	971	1109	1,0 <sup>b</sup>
$\beta$ -Pinène	973	1092	0,7 <sup>b</sup>
Myrcène	993	1158	6,4
$\alpha$ -Phellandrène	999	1151	<0,1
$\alpha$ -Terpinène	1014	1164	0,3
<i>p</i> -Cymène	1025	1257	0,5
Limonène	1030	1181	0,6
1,8-Cinéole	1034	1188	3,7
( <i>Z</i> )- $\beta$ -Ocimène	1046	1226	1,6
( <i>E</i> )- $\beta$ -Ocimène	1057	1244	1,5
$\gamma$ -Terpinène	1066	1231	1,2
Terpinolène	1096	1270	0,2
Linalool	1114	1558	1,7
Terpinèn-4-ol	1177	1572	0,3
$\alpha$ -Terpinéol	1189	1663	0,3

Composés	IR		Concentration (% relatif) <sup>a</sup>
	DB-5	SolGel-Wax	
Acétate de bornyle	1291	1553	<0,1
δ-Élémène	1339	1450	0,3
α-Cubébène	1349	1436	<0,1
α-Copaène	1371	1468	0,3
β-Élémène	1387	1558	1,4
(Z)-Caryophyllène	1397	1544	<0,1
α-Gurjunène	1398	1504	<0,1
(E)-Caryophyllène	1417	1566	20,6
γ-Élémène	1429	1604	0,8
α-Humulène	1448	1626	1,7
9-epi-(E)-Caryophyllène	1454	1600	0,1
<i>trans</i> -Muuro-la-3,5-diène	1457	1592	0,2
γ-Muuro-lène	1473	1715	1,5
β-Sélinène	1483	1673	2,9
α-Sélinène	1493	1679	2,6
α-Muuro-lène	1500	1686	0,6
Épizonarène	1506	1747	0,2
γ-Cadinène	1513	1650	2,0
δ-Cadinène	1524	1718	3,2
α-Cadinène	1535	-	0,4
α-Calacorène	1540	1863	0,1
Germacrène B	1552	1775	2,3
(E)-Nérolidol	1567	2004	3,7
Oxyde de caryophyllène	1576	1920	2,9
Gleenol	1579	1985	0,1
α-Muuro-lol	1642	-	0,4
Sélin-11-en-4α-ol	1649	2077	1,4
Germacrone	1690	2149	0,2
Total			72,5

<sup>a</sup> Valeurs obtenues par l'élution sur la colonne DB-5

<sup>b</sup> Valeurs obtenus par l'élution sur la colonne solgel-Wax

La caractérisation chimique présentée au tableau 11 correspond à l'huile de cèdre. Tel que relaté dans la littérature scientifique, l'huile de cèdre est principalement composée de monoterpènes (71,6 %) et de quelques sesquiterpènes (1,2 %) (Kéïta *et al.*, 2001; Simard *et al.*, 1988). Les composés majoritaires retrouvés dans l'huile sont le *cis*-thujone (28,6 %), le fenchone (10,7 %), le *trans*-thujone (8,7 %), le rimuène (7,6 %) et le beyerène (7,5 %). La concentration relativement élevée en diterpènes (16,2 %) n'a jamais été rapportée dans la littérature.

Tableau 11. Caractérisation chimique par GC/MS des composés de l'huile essentielle de cèdre

Composés	IR		Concentration (% relatif) <sup>a</sup>
	DB-5	SolGel-Wax	
α-Thujène	928	1016	0,3
α-Pinène	933	1010	<0,1
Camphène	946	1052	1,4
Sabinène	972	1110	3,3
Myrcène	990	1156	1,7
α-Phellandrène	999	1151	<0,1
p-Cymène	1026	1256	0,3
Limonène	1028	1181	2,0
γ-Terpinène	1065	1230	1,1
Fenchone	1096	1370	10,7
<i>cis</i> -Thujone	1119	1395	28,6
<i>trans</i> -Thujone	1129	1411	8,7
Camphor	1147	1479	1,7
Hydrate de camphène	1150	1565	0,4
Terpinèn-4-ol	1177	1572	1,6
α-Terpinéol	1188	1663	0,5
Méthyl éther carvacrol	1247	1577	0,2
Pipéritone	1255	1676	<0,1
néo-3-Acétate de thujanol	1271	1536	1,1

Composés	IR		Concentration (% relatif) <sup>a</sup>
	DB-5	SolGel-Wax	
Acétate de bornyle	1291	1553	4,7
3-Acétate de thujanol	1298	1568	0,5
Carvacrol	1313	2158	0,1
$\alpha$ -Acétate de terpinyle	1351	1661	1,5
$\gamma$ -Muuroène	1472	1685	<0,1
$\alpha$ -Muuroène	1497	1685	0,1
$\gamma$ -Cadinène	1509	1713	0,2
$\delta$ -Cadinène	1520	1716	0,5
Oxyde de caryophyllène	1570	1919	0,4
Rimuène	1889	2081	7,6
Beyerène	1914	2116	7,5
ent-Rosa-5,15-diène	1918	2127	0,5
Pimaradiène	1947	2170	0,4
Abietatriène	2043	2398	0,1
Total			89,1

<sup>a</sup> Valeurs obtenues par l'élution sur la colonne DB-5

L'huile essentielle de thé du Labrador extraite lors des présents travaux de recherche contient 52,1 % de monoterpènes tels que le sabinène (21,0 %), le limonène (5,2 %), l'acétate de bornyle (4,4 %) ainsi que près de 16 % de sesquiterpènes représentés majoritairement par le  $\beta$ -selinène (8,1 %), le rosifoliol (3,9 %) et le  $\alpha$ -selinène (1,8 %). Les résultats présentés dans ce document sont comparables à ceux obtenus par le groupe de Belleau qui s'était penché sur l'analyse de cette huile essentielle (Belleau *et al.*, 1993). Par contre, leur résultat révèle la présence majoritaire de germacrène B et de germacrone ce qui n'est pas le cas dans le présent travail.

Tableau 12. Caractérisation chimique par GC/MS des composés de l'huile essentielle de thé du Labrador

Composés	IR		Composition (% relatif) <sup>a</sup>
	DB-5	SolGel-Wax	
Tricyclène	921	-	0,2
$\alpha$ -Thujène	929	-	0,5
$\alpha$ -Pinène	935	1012	4,0
Camphène	948	1054	2,5
Sabinène	978	1117	21,0
Myrcène	991	1157	0,6
$\alpha$ -Phellandrène	999	1151	0,4
$\alpha$ -Terpinène	1015	1165	1,4
<i>p</i> -Cymène	1025	1258	1,3
Limonène	1032	1184	5,2
( <i>Z</i> )- $\beta$ -Ocimène	1045	1228	0,3
( <i>E</i> )- $\beta$ -Ocimène	1057	1244	0,1
$\gamma$ -Terpinène	1067	1233	3,4
Terpinolène	1096	1270	0,7
Pinocarvone	1165	1531	0,4
Bornéol	1168	1663	0,2
Terpinen-4-ol	1179	1574	2,4
<i>trans</i> - <i>p</i> -Mentha-1(7),8-dien-2-ol	1188	1756	0,3
Myrténal	1193	1584	1,8
<i>trans</i> -Carvéol	1219	1792	<0,1
<i>cis</i> - <i>p</i> -Mentha-1(7),8-dien-2-ol	1229	1845	0,2
Cuminaldéhyde	1240	1729	0,6
Carvone	1247	1685	<0,1
$\alpha$ -Terpinèn-7-al	1288	1736	<0,1
Acétate de bornyle	1293	1554	4,4
<i>p</i> -Cymèn-7-ol	1299	2043	0,1
Acétate de myrtényle	1331	1651	0,2
$\alpha$ -Copaène	1371	1468	<0,1
$\alpha$ -Gurjunène	1398	1507	0,2
$\alpha$ -Humulène	1446	1625	<0,1
Germacrène D	1478	1667	0,8
$\beta$ -Sélinène	1486	1676	8,1
$\alpha$ -Sélinène	1493	1680	1,8
Germacrène A	1501	1713	0,2
Germacrène B	1549	1773	0,2

Composés	IR		Composition (% relatif) <sup>a</sup>
	DB-5	SolGel-Wax	
Caryophyllène oxide	1573	1919	0,1
Rosifoliol	1598	2063	3,9
Cyclocolorénone	1752	-	0,5
Total			68,0

<sup>a</sup>Valeurs obtenues par l'élution sur la colonne DB-5

Tel que décrit dans le tableau 13, l'huile essentielle de myrique baumier contient principalement des sesquiterpènes (60,1 %) tels que du (E)-caryophyllène (11,1 %), du néo-intermédéol (7,3 %) et du  $\delta$ -cadinène (5,6 %). Quelques monoterpènes sont toutefois présents (26,4 %) représentés principalement par le  $\alpha$ -phellandrène (6,1 %) le myrcène (5,9 %) et le limonène (5,6 %). L'analyse de la composition chimique présenté dans cette recherche est similaire à celle réalisée par le groupe de Sylvestre, qui traite également de l'huile extraite sur des plantes originaire du Québec (Sylvestre *et al.*, 2005).

Tableau 13. Caractérisation chimique par GC/MS des composés de l'huile essentielle de myrique baumier

Composés	IR		Composition (% relatif) <sup>a</sup>
	DB-5	SolGel-Wax	
$\alpha$ -Thujène	929	1016	0,4
$\alpha$ -Pinène	935	1010	2,0
Camphène	948	1052	<0,1
Sabinène	973	1109	0,6
Myrcène	995	1160	5,9
$\alpha$ -Phellandrène	1006	1154	6,1
$\alpha$ -Terpinène	1017	1165	0,3
$p$ -Cymène	1027	1258	2,0

Composés	IR		Composition (% relatif) <sup>a</sup>
	DB-5	SolGel-Wax	
Limonène	1037	1184	5,6
(Z)-β-Ocimène	1048	1227	1,2
(E)-β-Ocimène	1059	1245	1,4
γ-Terpinène	1067	1231	0,4
Terpinolène	1097	1270	0,2
Linalool	1112	1537	0,2
Terpinèn-4-ol	1176	1572	0,1
Acétate de bornyle	1289	1552	<0,1
δ-Élémène	1339	1450	0,7
α-Cubébène	1349	1436	0,5
α-Ylangène	1367	1459	<0,1
α-Copaène	1371	1468	1,0
β-Élémène	1387	-	1,0
(E)-Caryophyllène	1417	1565	11,1
β-Copaène	1421	1517	0,2
γ-Élémène	1429	1604	<0,1
α-trans-Bergamotène	1433	1541	0,5
6,9-Guaiadiène	1440	1575	0,7
α-Humulène	1452	1626	4,9
β-Acoradiène	1459	2072	0,4
4,5-di-epi-Aristolochène	1465	1638	0,6
trans-Cadina-1(6),4-diène	1474	1626	1,8
γ-Muuroène	1476	1668	1,4
γ-Curcumène	1483	1660	2,1
ar-Curcumène	1489	1737	1,2
δ-Selinène	1492	1655	0,5
α-Selinène	1495	1679	1,1
α-Zingibérène	1497	1688	0,2
α-Muuroène	1500	1685	1,2
β-Curcumène	1515	1707	2,3
δ-Cadinène	1528	1718	5,6
trans-Cadina-1,4-diène	1533	-	1,2
α-Calacorène	1541	1863	0,1
Éléamol	1549	2029	0,3
Germacrène B	1552	1774	0,9
(E)-Nérolidol	1561	2003	1,7
Oxyde de caryophyllène	1575	1920	2,2
Gleenol	1579	1985	0,3

Composés	IR		Composition (% relatif) <sup>a</sup>
	DB-5	SolGel-Wax	
*	1625	-	2,7
Éremoligénol	1630	2115	1,6
néo-Intermédéol	1657	2180	7,3
β-Bisabolol	1670	-	0,8
Éléamol acétate	1677	-	0,7
Germacrone	1691	2149	1,0
α-Eudesmol acétate	1781	2120	0,3
Total			86,8

<sup>a</sup> Valeurs obtenues par l'élution sur la colonne DB-5

L'huile essentielle de pin blanc présentée au tableau 14 contient 52,0 % de monoterpènes tels que le β-pinène (13,8 %), le α-pinène (12,4 %) et le myrcène (7,9 %). Le α-cadinol (5,8 %), le δ-cadinène (4,2 %) et le germacrène D (3,2 %) sont pour leur part les principaux sesquiterpènes. Cette famille de composés représente près de 32% de l'huile essentielle. Le sclarene, un diterpène, est présent à près de 2 % dans l'huile essentielle. Il est intéressant de souligner qu'un composé minoritaire représentant 1,0 % de l'huile essentielle et possédant une indice de 1694 sur la colonne DB-5 n'a pu être identifié. La seule étude antérieure qui traite de l'huile essentielle de *Pinus strobus* a été réalisée en Pologne (Krauze-Baranowska *et al.*, 2002). Malgré quelques différences, les huiles essentielles sont similaires puisqu'elles sont toutes les deux composées des mêmes types de terpènes et que les molécules majoritaires sont comparables.



Tableau 14. Caractérisation chimique par GC/MS des composés de l'huile essentielle de pin blanc

Composés	IR		Composition (% relatif) <sup>a</sup>
	DB-5	SolGel-Wax	
Santène	885	-	0,1
Tricyclène	921	-	0,4
$\alpha$ -Pinène	939	1015	12,4
Camphène	949	1054	4,5
$\beta$ -Pinène	979	1100	13,8
Myrcène	995	1160	7,9
$\alpha$ -Phellandrène	1000	1152	0,9
$\delta$ -3-Carène	1006	1136	0,4
$\alpha$ -Terpinène	1015	1166	0,2
$\beta$ -Phellandrène	1032	1190	5,6
$\gamma$ -Terpinène	1065	1230	0,2
Terpinolène	1096	1271	1,4
endo-Fenchol	1120	1559	<0,1
Camphor	1146	1479	0,1
Hydrate de camphène	1149	1565	<0,1
<i>trans</i> -Pinocamphone	1161	1482	<0,1
Pinocarvone	1163	1531	<0,1
Bornéol	1166	1662	0,3
Terpinèn-4-ol	1176	1572	0,1
Myrtenal	1190	1583	<0,1
endo-Fenchyl acétate	1215	1445	<0,1
Acétate de bornyle	1291	1550	3,4
2-Undécanone	1302	1576	0,1
$\alpha$ -Cubébène	1348	1436	0,1
$\alpha$ -Copaène	1369	1468	0,1
$\beta$ -Bourbonène	1376	1494	<0,1
( <i>E</i> )-Caryophyllène	1407	1563	2,1
<i>trans</i> -Muuro-la-3,5-diène	1438	1598	0,1
$\alpha$ -Humulène	1444	1625	1,1
<i>trans</i> -Cadina-1(6),4-diène	1469	1621	0,3
Germacrène D	1477	1667	3,2
<i>trans</i> -Muuro-la-4(14),5-diène	1485	1669	0,4
Bicyclogermacrène	1492	1688	1,4
$\alpha$ -Muuro-lène	1498	1686	1,2
Épizonarène	1498	1718	1,2

δ-Amorphène	1502	1677	0,3
γ-Cadinène	1511	1714	1,6
δ-Cadinène	1523	1718	4,2
<i>trans</i> -Cadina-1,4-diène	1528	1783	0,3
α-Cadinène	1533	1747	0,4
Spathulenol	1568	2065	0,6
Oxyde de caryophyllène	1571	1920	0,3
Humulène époxyde II	1594	1970	0,4
1-epi-Cubenol	1624	1997	0,5
épi-α-Cadinol	1633	2114	2,8
épi-α-Muurolol	1636	2128	2,4
α-Muurolol	1640	-	1,1
α-Cadinol	1652	2167	5,8
*	1694	-	1,0
Sclarene	1977	-	1,8
Total			86,8

<sup>a</sup> Valeurs obtenues par l'élution sur la colonne DB-5

## CHAPITRE 6

### CONCLUSION ET PERSPECTIVES FUTURES

Dans le cadre de ce projet de recherche, 17 plantes issues de la forêt boréale ont été étudiées dans le but d'évaluer l'effet antibactérien de leurs huiles essentielles et de déterminer la composition chimique de celles-ci. Sur les 17 essences traitées, nous avons obtenu une huile essentielle pour 9 d'entre elles. L'évaluation du potentiel antibactérien ainsi que la composition chimique de ces huiles essentielles ont été effectuées conformément aux objectifs de recherche. L'huile essentielle d'*A. millefolium* présente le meilleur potentiel antibactérien, mais était en partie déjà connue. Celles issues de *T. farfara* et *T. vulgare* se sont distinguées par le manque de connaissance sur l'activité antibiotique et également au niveau de leurs compositions chimiques.

Au meilleur de nos connaissances, nous avons démontré pour la première fois l'activité antibactérienne de l'huile de *T. farfara* observée contre *S. aureus* et *E. coli*. Afin d'identifier les composés principalement responsables de ces activités antibactériennes, la composition chimique a été analysée par chromatographie gazeuse. La caractérisation chimique de celle-ci n'avait jamais été réalisée avec des plantes issues de l'Amérique du Nord. La caractérisation chimique de *T. farfara* a permis de voir que cette huile était majoritairement composée de molécules aliphatiques (1-nonène, 1,10-undecadiène, acide dodécanoïque). Une aussi haute teneur en ce type de composé dans une huile essentielle est rare. Pour répondre aux objectifs du projet, plusieurs composés identifiés dans cette huile essentielle ont été testés pour connaître leur pouvoir antibactérien. Au final, l'activité

antibactérienne de l'huile essentielle de *T. farfara* est expliquée en partie par l'acide dodécanoïque.

Dans le cadre de ce projet, nous avons montré l'activité antibactérienne de *T. vulgare* ce qui n'avait également jamais été rapportée dans la littérature scientifique. L'analyse par chromatographie gazeuse a permis de voir que l'huile était principalement composée de monoterpènes (camphre ,1,8-cinéole, bornéol) ce qui avait déjà été identifiée. Le camphre est, comme pour l'huile essentielle de *T.farfara*, en partie responsable de l'activité contre *S. aureus* alors que le *p*-cymène est en partie responsable de l'activité contre *E. coli*.

L'ensemble des huiles essentielles issues de la forêt boréale traitées dans ce projet et certaines des molécules qui les composent possèdent des propriétés antibactériennes contre *E. coli* et *S. aureus*. Il serait intéressant de poursuivre ces travaux en évaluant l'activité de ces huiles essentielles et de ces composés contre d'autres souches bactériennes. Poursuivre en regardant le potentiel des huiles essentielles et de ces composés comme facteur de croissance en remplacement des antibiotiques utilisés actuellement serait d'intérêt également.

## CHAPITRE 7

## BIBLIOGRAPHIE

- Aarestrup, F. M. (1999). Review-Association between the consumption of antimicrobial agents in animal husbandry and the occurrence of resistant bacteria among food animals. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 12(4), 279–85.
- Adamczak, A., Buchwald, W., & Gryszczyńska, A. (2012). Phytochemical variability of coltsfoot (*Tussilago farfara* L.) in Poland. *Herba Polonica*, 58(4), 7–14.
- Adams, R. P. (2007). *Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry* (4th ed., p. 804). Allured Publishing Corporation.
- Alvarez, A. L., Habtemariam, S., Juan-Badaturuge, M., Jackson, C., & Parra, F. (2011). In vitro anti HSV-1 and HSV-2 activity of *Tanacetum vulgare* extracts and isolated compounds: an approach to their mechanisms of action. *Phytotherapy Research*, 25(2), 296–301.
- Aoita, Y., & Kikuchi, M. (1998). Triterpenoids from Flower Buds of *Tussilago farfara* L. *Natural Medicines*, 52(3), 273–275.
- Aoita, Y., Amazawa, H. K., & Ikuchi, M. K. (1999). Structures of New Oplopane-Type Sesquiterpenoids from the Flower Buds of *Tussilago farfara* L. 47(May), 705–707.
- Appendino, G., Gariboldi, P., & Nano, G. M. (1982). Crispolide, an unusual hydroperoxy sesquiterpene lactone from *tanacetum vulgare*. *Phytochemistry*, 21(5), 1099–1102.
- Appendino, G., Gariboldi, P., Nano, Gi. M., & Tétényit, P. (1984). Tetrahydrofuran-type terpenoids from *Tanacetum vulgare*. *Phytochemistry*, 23(11), 2545–2551.
- Arnason, T., Hebda, R.J., Johns, T. (1981). Use of plants for food and medicine by Native Peoples of eastern Canada. *Canadian Journal of Botany*, 59, 2189–2325.
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., & Idaomar, M. (2008). Biological effects of essential oils - A review. *Food and Chemical Toxicology*, 46, 446–75.
- Bandoniene, D., Pukalskas, A., Venskutonis, P. R., & Gruzdiene, D. (2000). Preliminary screening of antioxidant activity of some plant extracts in rapeseed oil. *Food Research International*, 33, 785–791.
- Bayrak, A., & Akgül, A. (1994). Volatile oil composition of Turkish rose (*Rosa damascena*). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 64(4), 441–448.

- Belleau, F., & Collin, G. (1993). Composition of the essential oil of *Ledum groenlandicum*. *Phytochemistry*, 33(1), 117–121.
- Bonjar, S. (2004). Evaluation of antibacterial properties of some medicinal plants used in Iran. *Journal of Ethnopharmacology*, 94(2-3), 301–5.
- Bothelo, M. ., Nogueira, N. A. P., Bastros, G. M., Fonseca, S. G. C., Lemos, T. L. G., Matos, F. J. A., ... Brito, G. A. C. (2007). Antimicrobial activity of the essential oil from *Lippia sidoides*, carvacrol and thymol against oral pathogens. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 40(3), 349–356.
- Bruneton, J. (2009). *Pharmacognosie: phytochimie, plantes médicinales* (4th ed., pp. 567–951). Paris: Technique & Documentation.
- Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods--a review. *International Journal of Food Microbiology*, 94(3), 223–53.
- Bush, K. (2004). Antibacterial drug discovery in the 21st century. *Clinical Microbiology and Infection*, 10(4), 10–17.
- Campbell, N. A., & Reece, J. B. (2007). *Biologie* (3rd ed., pp. 370–380). Éditions du renouveau pédagogique.
- Candan, F., Unlu, M., Tepe, B., Daferera, D., Polissiou, M., Sökmen, A., & Akpulat, H. A. (2003). Antioxidant and antimicrobial activity of the essential oil and methanol extracts of *Achillea millefolium* subsp. *millefolium* Afan. (Asteraceae). *Journal of Ethnopharmacology*, 87, 215–220.
- Capasso, R., Izzo, a a, Pinto, L., Bifulco, T., Vitobello, C., & Mascolo, N. (2000). Phytotherapy and quality of herbal medicines. *Fitoterapia*, 71 Suppl 1, S58–S65.
- Chanaj-kaczmarek, J., Wojcińska, M., & Matławska, I. (2013). Phenolics in the *Tussilago farfara* leaves. *Herba Polonica*, 59(1), 35–43.
- Chandler, R. F., Hooper, S. N., & Harvey, M. J. (1982). Ethnobotany and Phytochemistry of Yarrow, *Achillea millefolium*, Compositae. *Economic Botany*, 36(2), 203–223.
- Chandra, A., Misra, L. N., & Thakur, R. S. (1987a). Germacranolides and an alkyl glucoside from *Tanacetum vulgare*. *Phytochemistry*, 26(5), 1463–1465.



- Chandra, A., Misra, L. N., & Thakur, R. S. (1987b). Tanavulgarol, an Oxygenated Sesquiterpene with an Uncommon Skeleton from *Tanacetum vulgare*. *Phytochemistry*, 26(11), 3077–3078.
- Chiasson, H., Bélanger, A., Bostanian, N., Vincent, C., & Poliquin, A. (2001). Acaricidal Properties of *Artemisia absinthium* and *Tanacetum vulgare* (Asteraceae) Essential Oils Obtained by Three Methods of Extraction. *Journal of Economic Entomology*, 94(1), 167–171.
- Cho, J., Kim, H. M., Ryu, J.-H., Jeong, Y. S., Lee, Y. S., & Jin, C. (2005). Neuroprotective and antioxidant effects of the ethyl acetate fraction prepared from *Tussilago farfara* L. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 28(3), 455–60.
- Collin, G. J., Deslauriers, H., Pageau, N., & Gagnon, M. (1993). Essential Oil of Tansy (*Tanacetum vulgare* L.) of Canadian Origin. *Journal of Essential Oil Research*, 5(6), 629–638.
- Corpet, D. E. (2000). Mécanismes de la promotion de croissance des animaux par les additifs alimentaires. *Revue de médecine vétérinaire*, 151(2), 99-104.
- Coulter, C. L., Collin, G. J., Hachey, J., Simard, S., Vernin, G., & Fraisse, D. (1988). Extraction and GC-MS Analysis of the Essential Oil of *Comptonia peregrina* (L.) Coulter. *Flavour and Fragrance Journal*, 3, 65–68.
- Craig, W. J. (1999). Health-promoting properties of common herbs. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 70, 491–499.
- De Pooter, H. L., Vermeesch, J., & Schamp, N. M. (1989). The essential oils of *Tanacetum vulgare* L. and *Tanacetum parthenium* (L.) Scultz-Bip. *Journal of Essential Oil Research*, 1(1), 9–13.
- Dorman, H. J., & Deans, S. G. (2000). Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology*, 88(2), 308–16.
- Duke, J. A. (1985). *Handbook of medicinal herbs* (Second Edi., p. 896). CRC Press.
- El-Shazly, A., Dorai, G., & Wink, M. (2002). Composition and antimicrobial activity of essential oil and hexane-ether extract of *Tanacetum santolinoides* (dc.) Feinbr. and Fertig. *Zeitschrift Für Naturforschung. C, Journal of Biosciences*, 57(7-8), 620–3.

- Franchomme, P., & Pénnoël, D. (1990). *L'aromathérapie exactement. Encyclopédie de l'utilisation thérapeutique des huiles essentielles*. (R. Jallois, Ed.) (p. 445). Limoges.
- Gabel, B., Thiéry, D., Suchy, V., Marion-Poll, F., Hradsky, P., & Farkas, P. (1992). Floral Volatiles of *Tanacetum Vulgare* L. Attractive to *Lobesia botrana* Den. et Schiff. Females. *Journal of Chemical Ecology*, 18(5), 693–701.
- Gallino, M. (1988). Essential oil from *Tanacetum vulgare* growing spontaneously in Tierra del fuego (Argentina). *Planta Medica*, 52, 182.
- Gao, H., Huang, Y.-N., Gao, B., Xu, P.-Y., Inagaki, C., & Kawabata, J. (2008).  $\alpha$ -Glucosidase inhibitory effect by the flower buds of *Tussilago farfara* L. *Food Chemistry*, 106(3), 1195–1201.
- Gauthier, A., & Laliberté, F. (2011). Portrait de la ressource forêt du Saguenay–Lac-Saint-Jean. *CRRNT*.
- Geslin, E., Fremaux, A., Sissia, G., Spicq, C., & Aberrane, S. (1994). Epidémiologie de la résistance aux antibiotiques de *Streptococcus pneumoniae* en France. Réseau national de surveillance (1984-1993). *Médecine et Maladies Infectieuses*, 24(5), 948–961.
- Hendricks, H., Van der Elst, D. J. D., Van Putten, F. M. S., & Bos, R. (1990). The essential Oils of Dutch Tansy (*Tanacetum vulgare* L.). *Journal of Essential Oil Research*, 2(4), 155–162.
- Héthelyi, E., Tétényl, P., Kettenes-Van Den Bosch, J. J., Salemink, C. A., Heerma, W., Versluis, C., ... Sipma, G. (1981). Essential Oils of Five *Tanacetum Vulgare* Genotypes. *Phytochemistry*, 20(8), 1847–1850.
- Hirono, I., Mori, H., & Culvenor, C. (1976). Carcinogenic activity of coltsfoot, *Tussilago farfara* L. *Gann*, 67(1), 125–129.
- Holetz, F. B., Pessini, G. L., Sanches, N. R., Cortez, D. A. G., Nakamura, C. V., & Filho, B. P. D. (2002). Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 97(7), 1027–31.
- Hong, J., Aoyama, S., Hirasawa, N., Zee, O., Ishihara, K., Hashida, C., ... Ohuchi, K. (2011). Suppression of intracellular calcium levels and inhibition of degranulation in RBL-2H3 mast cells by the sesquiterpene lactone parthenolide. *Planta Medica*, 77(3), 252–6.

- Hooper, S. N., & Chandler, R. F. (1984). Herbal remedies of the Maritime Indians: phytosterols and triterpenes of 67 plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 10(2), 181–94.
- Hwang, S.-B., Chang, M. N., Garcia, M. L., Han, Q. Q., Huang, L., King, V. F., ... Winqvist, R. J. (1987). L-652,469 - a dual receptor antagonist of platelet activating factor and dihydropyridines from *Tussilago farfara* L. *European Journal of Pharmacology*, 141(2), 269–281.
- Hwangbo, C., Lee, H. S., Park, J., Choe, J., & Lee, J.-H. (2009). The anti-inflammatory effect of tussilagone, from *Tussilago farfara*, is mediated by the induction of heme oxygenase-1 in murine macrophages. *International Immunopharmacology*, 9(13-14), 1578–84.
- Izzo, A. A., Carlo, G. Di, Biscardi, D., Fusco, R. De, Mascolo, N., Borrelli, F., & Capasso, F. (1995). Biological Screening of Italian Medicinal Plants for Antibacterial Activity. *Phytotherapy Research*, 9, 281–286.
- Juan-Badaturuge, M., Habtemariam, S., Jackson, C., & Homas, M. J. K. (2009). Antioxidant principles of *Tanacetum vulgare* L. aerial parts. *Natural Product Communications*, 4(11), 1561–1564.
- Judzentiene, A., & Budiene, J. (2011). Volatile Oils of Flowers and Stems of *Tussilago farfara* L. from Lithuania. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 14(4), 413–416.
- Kéïta, S. M., Vincent, C., Schmidt, J., & Arnason, J. T. (2001). Insecticidal effects of *Thuja occidentalis* ( Cupressaceae ) essential oil on *Callosobruchus maculatus* [ Coleoptera : Bruchidae ]. *Canadian Journal of Plant Science*, 81(1), 173–177.
- Keskitalo, M., Pehu, E., & Simon, J. (2001). Variation in volatile compounds from tansy (*Tanacetum vulgare* L.) related to genetic and morphological differences of genotypes. *Biochemical Systematics and Ecology*, 29(3), 267–285.
- Kim, M.-R., Lee, J. Y., Lee, H.-H., Aryal, D. K., Kim, Y. G., Kim, S. K., ... Kang, K. W. (2006). Antioxidative effects of quercetin-glycosides isolated from the flower buds of *Tussilago farfara* L. *Food and Chemical Toxicology*, 44(8), 1299–307.
- Knoblocha, K., Paulia, A., Iberla, B., Weiganda, H., & Weisa, N. (1989). Antibacterial and Antifungal Properties of Essential Oil Components. *Journal of Essential Oil Research*, 1(3), 119–128.

- Kokoska, L., Polesny, Z., Rada, V., Nepovim, A., & Vanek, T. (2002). Screening of some Siberian medicinal plants for antimicrobial activity. *Journal of Ethnopharmacology*, 82(1), 51–3.
- Krauze-Baranowska, M., Mardarowicz, M., Wiwart, M., Pobłocka, L., & Dynowska, M. (2002). Antifungal activity of the essential oils from some species of the genus *Pinus*. *Journal of Biosciences*, 57, 478–82.
- Kurkina, A. . V., Khusainova, A. I., Daeva, E. D., & Kadentsev, V. I. (2011). Flavonoids from *Tanacetum vulgare* flowers. *Chemistry of Natural Compounds*, 47(2), 284–285.
- Lachance, J.-P. (2012) Perspectives sectorielles 2012-2014 - Saguenay-Lac-Saint-Jean. *Service Canada*, 4-25.
- Lahlou, S., Israili, Z. H., & Lyoussi, B. (2008). Acute and chronic toxicity of a lyophilised aqueous extract of *Tanacetum vulgare* leaves in rodents. *Journal of Ethnopharmacology*, 117(2), 221–7.
- Lahlou, S., Tahraoui, A., Israili, Z., & Lyoussi, B. (2007). Diuretic activity of the aqueous extracts of *Carum carvi* and *Tanacetum vulgare* in normal rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 110, 458–463.
- Lahlou, S., Tangi, K. C., Lyoussi, B., & Morel, N. (2008). Vascular effects of *Tanacetum vulgare* L. leaf extract: In vitro pharmacological study. *Journal of Ethnopharmacology*, 120, 98–102.
- Lambert, R. J., Skandamis, P. N., Coote, P. J., & Nychas, G. J. (2001). A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *Journal of Applied Microbiology*, 91(3), 453–62.
- Langhout, P. (2000). New additives for broiler chickens. *World's Poultr*, 16, 22–27.
- Larocque, N., Vincent, C., Bélanger, A., & Bourassa, J.-P. (1999). Effects of Tansy Essential Oil from *Tanacetum vulgare* on Biology of Oblique-Banded Leafroller, *Choristoneura rosaceana*. *Journal of Chemical Ecology*, 25(6), 1319–1330.
- Lawrence, B. M., & Weaver, K. M. (1974). Comparative Chemical Composition of the Essential Oils of *Myrica gale* and *Comptonia peregrina*. *Planta Medica*, 25, 385–388.

- Li, W., Huang, X., & Yang, X.-W. (2012). New sesquiterpenoids from the dried flower buds of *Tussilago farfara* and their inhibition on NO production in LPS-induced RAW264.7 cells. *Fitoterapia*, 83(2), 318–22.
- Li, Y., & Wang, Y.-M. (1988). Evaluation of Tussilagone: a cardiovascular-respiratory stimulant isolated from Chinese herbal medicine. *General Pharmacology*, 19(2), 261–263.
- Li, Z.-Y., Zhi, H.-J., Xue, S.-Y., Sun, H.-F., Zhang, F.-S., Jia, J.-P., ... Qin, X.-M. (2012). Metabolomic profiling of the flower bud and rachis of *Tussilago farfara* with antitussive and expectorant effects on mice. *Journal of Ethnopharmacology*, 140(1), 83–90.
- Lim, H. J., Lee, H.-S., & Ryu, J.-H. (2008). Suppression of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 expression by tussilagone from farfarae flos in BV-2 microglial cells. *Archives of Pharmacal Research*, 31(5), 645–652.
- Liu, L.-L., Yang, J.-L., & Shi, Y.-P. (2011). Sesquiterpenoids and other constituents from the flower buds of *Tussilago farfara*. *Journal of Asian Natural Products Research*, 13(10), 920–9.
- Lucchesi, M. E., Chemat, F., & Smadja, J. (2004). Solvent-free microwave extraction of essential oil from aromatic herbs: comparison with conventional hydro-distillation. *Journal of Chromatography A*, 1043(2), 323–327.
- Lucchesi, M. E., Extraction sans solvant assistée par micro-ondes conception et application à l'extraction des huiles essentielles. *Université de la Réunion*, 2005.
- Manou, I., Bouillard, L., Devleeschouwer, M. J., & Barel, a O. (1998). Evaluation of the preservative properties of *Thymus vulgaris* essential oil in topically applied formulations under a challenge test. *Journal of Applied Microbiology*, 84(3), 368–76.
- Marie-Victorin, F. (1995). *Flore Laurentienne* (3rd ed., p. 1081). Les presses de l'université de Montréal.
- Marie-Victorin, F., Rouleau, E., & Brouillet, L. (2002). *Flore laurentienne* (3rd ed., p. 570). Les presses de l'université de Montréal.
- Miguel, M. G. (2010). Antioxidant and anti-inflammatory activities of essential oils: a short review. *Molecules*, 15, 9252–9287.

- Mitich, W. L. (1992). Tansy. *Weed Technologie*, 6 (1), 242-244.
- Mockute, D., & Judzentiene, A. (2004). Composition of the Essential Oils of *Tanacetum vulgare* L. Growing Wild in Vilnius District (Lithuania). *Journal of Essential Oil Research*, 16, 550–553.
- Moerman, E. D. (1998). *Native American Ethnobotany* (1 ed., p. 927) Timber Press.
- Nano, G. M., Bicchi, C., Frattini, C., & Gallino, M. (1979). Wild Piedmontese Plants- A Rare Chemotype of *Tanacetum vulgare* L., Abundant in Piedmont (Italy). *Hippokrates Verlag GmbH*, 35, 270–274.
- Naves, Y.-R. (1949). Etudes sur les matières végétales volatiles XCVIII). Sur les esters méthyliques constituants de l'huile essentielle d'iris. *Chimica Acta*, 32(7), 2306–2309.
- Ognyanov, I., Todorova, M., Dimitrov, V., Ladd, J., Irngartinger, H., Kurda, E., & Rodewald, H. (1983). Cis-Longipinane-2,7-dione, a sesquiterpene diketone in flowers of *Tanacetum vulgare*. *Phytochemistry*, 22(8), 1775–1777.
- Orav, A., Kailas, T., & Ivask, K. (2001). Composition of the Essential Oil from *Achillea* Composition of the Essential Oil from *Achillea millefolium* L. from Estonia. *Journal of Essential Oil Research*, 13, 290–294.
- Pålsson, K., Jaenson, T. G. T., Bäckström, P., & Borg-Karlson, A.-K. (2008). Tick Repellent Substances in the Essential Oil of *Tanacetum vulgare*. *Journal of Medical Entomology*, 45(1), 88–93.
- Phillips, I., Casewell, M., Cox, T., De Groot, B., Friis, C., Jones, R., Nightingale, C., Preston, R. & Waddel, J. (2004). Does the use of antibiotics in food animals pose a risk to human health? A critical review of published data. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 53, 28–52
- Pichette, A., Larouche, P.-L., Lebrun, M., & Legault, J. (2006). Composition and antibacterial activity of *Abies balsamea* essential oil. *Phytotherapy Research*, 20, 371–373.
- Piochon, M. (2008). *Étude des huiles essentielles d'espèces végétales de la flore laurentienne: composition chimique, activités pharmacologiques et hémisynthèse*. UQAC.

- Polle, A. Y., Ovodova, R. G., Shashkov, A. S., & Ovodov, Y. S. (2002). Some structural features of pectic polysaccharide from tansy, *Tanacetum vulgare* L. *Carbohydrate Polymers*, 49, 337–344.
- Répertoire Québec Nature. (2013). Tussilage pas-d'âne. [en ligne]. *Répertoire Québec Nature*.  
[http://www.repertoirequebecnature.com/vasculaires/Tussilago\\_farfara.html](http://www.repertoirequebecnature.com/vasculaires/Tussilago_farfara.html)  
 [page consultée le 9 janvier 2014].
- Rohloff, J., Mordal, R., & Dragland, S. (2004). Chemotypical variation of tansy (*Tanacetum vulgare* L.) from 40 different locations in Norway. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(6), 1742–1748.
- Rosselli, S., Bruno, M., Raimondo, F. M., Spadaro, V., Varol, M., Koparal, A. T., & Maggio, A. (2012). Cytotoxic effect of eudesmanolides isolated from flowers of *Tanacetum vulgare* ssp. *siculum*. *Molecules*, 17(7), 8186–95.
- Ryu, J. H., Jeong, Y. S., & Sohn, D. H. (1999). A new bisabolene epoxide from *Tussilago farfara*, and inhibition of nitric oxide synthesis in LPS-activated macrophages. *Journal of Natural Products*, 62(10), 1437–8.
- Scheerer, W. R. (1984). Components of Oil of Tansy (*Tanacetum vulgare*) that Repel Colorado Potato Beetles (*Leptinotarsa Decemlineata*). *Journal of Natural Products*, 47(6), 964–969.
- Schinella, G. R., Giner, R. M., Recio, M. C., Mordujovich de Buschiazso, P., Ríos, J. L., & Máñez, S. (1998). Anti-inflammatory effects of South American *Tanacetum vulgare*. *The Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 50(9), 1069–74.
- Sell, C. S. (2006). *The Chemistry of Fragrance. From Perfumer to Consumer*. (2nd ed., p. 329). Cambridge: The Royal Society of Chemistry.
- Simard, S., Hachey, J., & Collin, G. J. (1988). The Variations of Essential Oil Composition During the Extraction Process. The Case of *Thuja occidentalis* L. and *Abies balsamea* (L.) Mill. *Journal of Wood Chemistry and Technology*, 8(4), 561–573.
- Singer, P., Shapiro, H., Theilla, M., Anbar, R., Singer, J., & Cohen, J. (2008). Anti-inflammatory properties of omega-3 fatty acids in critical illness: novel mechanisms and an integrative perspective. *Intensive Care Medicine*, 34(9), 1580–92.

- Starr, M. P., & Reynolds, D. M. (1951). Streptomycin Resistance of Coliform Bacteria from Turkeys Fed Streptomycin. *American Journal of Public Health*, 41, 1375–1380.
- Sylvestre, M., Legault, J., Dufour, D., & Pichette, A. (2005). Chemical Composition and Anticancer Activity of Leaf Essential Oil of *Myrica gale* L. *Phytomedicine*, 12, 299–304.
- Sylvestre, M., Pichette, A., Lavoie, S., Longtin, A., & Legault, J. (2007). Composition and Cytotoxic Activity of the Leaf Essential Oil of *Comptonia peregrina* (L.) Coulter. *Phytotherapy Research*, 21, 536–540.
- Teisseire, P. J. (1991). *Chimie des substances odorantes* (pp. 9–23). Paris: Technique et documentation.
- Tétényl, P., Kaposi, P., & Héthelyi, E. (1975). Variations in the essential oils of *tanacetum vulgare*. *Phytochemistry*, 14, 1539–1544.
- Thompson, J. D., Chalchat, J.-C., Michet, A., Linhart, Y. B., & Ehlers, B. (2003). Qualitative and quantitative variation in monoterpene co-occurrence and composition in the essential oil of *Thymus vulgaris* chemotypes. *Journal of Chemical Ecology*, 29(4), 859–80.
- Tournier, H., Schinella, G., de Balsa, E. M., Buschiazzi, H., Mañez, S., & Mordujovich de Buschiazzi, P. (1999). Effect of the chloroform extract of *Tanacetum vulgare* and one of its active principles, parthenolide, on experimental gastric ulcer in rats. *The Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 51(2), 215–9.
- Turgeon, M. (2003). Aperçu des produits forestiers non ligneux (PFNL). [en ligne] Ministère des ressources naturelles, de la faune et des pacs.
- Vila, R., Mundina, M., Tomi, F., Furlan, R., Zacchino, S., Casanova, J., & Canigüel, S. (2002). Composition and Antifungal Activity of the Essential Oil of *Solidago chilensis*. *Planta Medica*, 68, 164–167.
- W. Freckmann, R. (n.d.). Family Asteraceae - *Tanacetum vulgare* L. [en ligne]. <http://wisplants.uwsp.edu/scripts/detail.asp?SpCode=TANVUL> [page consultée le 9 janvier 2014].



- Wang, D., Fang, L., Wang, X., Qiu, J., & Huang, L. (2011). Preparative separation and purification of sesquiterpenoids from *tussilago farfara* L. by high-speed counter-current chromatography. *Química Nova*, 34(5).
- Wiley, J., Chao, S., Young, G., Oberg, C., & Nakaoka, K. (2008). Inhibition of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ( MRSA ) by essential oils, 444–449.
- Wilkomirski, B., & Kucharska, E. (1992). Triterpene chemotypes of some polish populations of *Tanacetum vulgare*. *Phytochemistry*, 31(11), 3915–3916.
- William, P., & Losa, R. (2001). The use of essential oils and their compounds in poultry nutrition. *World Poultry*, 17, 14–15.
- Williams, C. A., Harborne, J. B., & Eagles, J. (1999). Variation in lipophilic and polar flavonoids in the genus *Tanacetum*. *Phytochemistry*, 52, 1301–1306.
- Williams, C. A., Harborne, J. B., Geiger, H., & Hoult, J. R. S. (1999). The flavonoids of *Tanacetum parthenium* and *T. vulgare* and their anti-inflammatory properties. *Phytochemistry*, 51, 417–423.
- Windisch, W., Schedle, K., Plitzner, C., & Kroismayr, A. (2008). Use of phytogenic products as feed additives for swine and poultry. *Journal of Animal Science*, 86(E. Supple.), E140–E148.
- Wojdylo, A., Oszmianski, J., & Czemerys, R. (2007). Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. *Food Chemistry*, 105(3), 940–949.
- Wolf, V. C., Gassmann, A., Clasen, B. M., Smith, A. G., & Müller, C. (2012). Genetic and chemical variation of *Tanacetum vulgare* in plants of native and invasive origin. *Biological Control*, 61(3), 240–245.
- Wu, D., Zhang, M., Zhang, C., & Wang, Z. (2008). Chromones from the flower buds of *Tussilago farfara*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 36(3), 219–222.
- Yayi-Ladekan, E., Kpoviessi, S. S. D., Gbaguidi, F., Kpadonou-Kpoviessi, B. G. H., Gbénou, J. D., Jolival, C., ... Quetin-Leclercq, J. (2012). Variation diurne de la composition chimique et influence sur les propriétés antimicrobiennes de l'huile essentielle d'*Ocimum canum* Sims cultivée au Bénin. *Phytothérapie*, 10(4), 229–237.

- Yu-feng, L., Xiu-wei, Y., & Bin, W. (2006). GC-MS Analysis of Essential Oil Constituents from Buds of *Tussilago farfara* L. *Journal of Chinese Pharmaceutical Sciences*, 15(4), 10–15.
- YuFeng, L., & XiuWei, Y. (2009). HPLC fingerprint of chemical constituents of Flos Farfarae. *Acta Pharmaceutica Sinica*, 44(5), 510–514.
- Zhi, H.-J., Qin, X.-M., Sun, H.-F., Zhang, L.-Z., Guo, X.-Q., & Li, Z.-Y. (2012). Metabolic fingerprinting of *Tussilago farfara* L. using H-NMR spectroscopy and multivariate data analysis. *Phytochemical Analysis*, 23(5), 492–501.

